УДК 576.32/.36(075.8)
ББК 28.05я73
К183

Рецензенты:
профессор кафедры физиологии человека и животных МГУ,
д-р биол. наук *О. П. Балезина*;
рук. отдела Института физиологии Шарите Берлинского университета
им. Гумбольдта, д-р биол. наук, профессор *С. И. Кирищук*

Камкин А. Г.
К183 Физиология и молекулярная биология мембран клеток : учеб. пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений / А. Г. Камкин, И. С. Киселева. — М. : Издательский центр «Академия», 2008. — 592 с.
ISBN 978-5-7695-4099-8

Изложены современные представления об электрофизиологии и молекулярной биологии мембран клеток. Освещены вопросы молекулярной организации биологических мембран, пассивных электрических свойств мембран, путей перемещения ионов через мембраны клеток. Даны общие представления о структуре и функциях ионных каналов. Описан пассивный ионный транспорт, рассматриваются потенциалы клеток и их связь с ионными токами. Приведены молекулярная организация и функции потенциалуправляемых натриевых, кальциевых и калиевых каналов, обсуждаются отдельные аспекты лигандуправляемых каналов, подробно рассмотрена работа механосенситивных каналов. Дана новая классификация каналов.

Для студентов медицинских и биологических высших учебных заведений.

УДК 576.32/.36(075.8)
ББК 28.05я73

ISBN 978-5-7695-4099-8

ПОСВЯЩАЕТСЯ НАШИМ РОДИТЕЛЯМ

ПРЕДИСЛОВИЕ

Настоящая книга — это попытка авторов изложить современные данные о физиологии и молекулярной биологии мембран клеток. Основное внимание изложенного материала сфокусировано на ионных каналах, их молекулярно-биологической структуре и функциях, механизмах селективности и проводимости, а также на многих других актуальных вопросах.

Последние годы ознаменовались тем, что наши знания о структуре и функциях мембран клеток перешли на качественно иной уровень: наступил значительный прорыв представлений в данной области. Это произошло благодаря огромным достижениям в области молекулярной биологии клетки и биофизики клеточных мембран, что позволило вывести на качественно иной уровень принципы создания фармакологических препаратов и определить подходы к лечению тех или иных заболеваний, хотя в основе всего этого по-прежнему лежат мембрана клетки и ее структура. Сегодня уже невозможно осуществлять квалифицированное лечение пациентов или проводить научные исследования без знания принципиальных механизмов, лежащих в основе функций организма, а следовательно, без глубокого знания работы клеток и их важнейшей структуры — мембраны.

Историю развития наших представлений, начавшихся прежде всего с электрофизиологии мембраны клеток, можно проследить по знаковым книгам, которые выходили в свет в определенные периоды, когда их авторы — крупнейшие ученые — подводили некоторые итоги как своих работ, так и работ своих коллег. К числу первых книг принадлежит небольшой по объему, но эпохальный труд A.L. Hodgkin «The Conduction of the Nervous Impulse» (1964); аналогичную книгу издал B. Katz «Nerve, Muscle and Synapse» (1966). Знаковым на Западе стало издание книги B. Hille «Ionic Channels of Excitable Membranes» (1992, 2001).

В СССР к эпохальным трудам в этом направлении отнесены книги Б. И. Ходорова «Проблема возбудимости» (1969) и «Общая физиология возбудимых мембран» (1975), И. С. Магуры «Проблемы электрической возбудимости нейрональной мембраны» (1981), П. Г. Костюка и О. А. Крышталя «Механизмы электрической возбудимости нервной клетки» (1981), основной упор в которых сделан на кальциевых токах.

Параллельно М.Б.Беркинблит с соавторами издал великолепную книгу «Высокопроницаемые контакты мембран» (1981), хотя этот труд посвящен лишь одному аспекту функций мембран. В 1986 г. П.Г.Костюк издал книгу «Кальций и клеточная возбудимость» (1986), в которой обсуждаются только кальциевые токи. Однако все эти работы касались потенциалуправляемых ионных каналов. По этим каналам в свет выходили только отдельные статьи, да и B.Hille в книгах своей серии уделял этим каналам очень мало внимания. В 1989 г. А.Г.Камкин и И.С.Киселева издали книгу «Техническое обеспечение микроэлектронного исследования клеток», которая стала популярной не только в СССР, но и зарубежом.

Далее наступил длительный перерыв, во всяком случае в России, после которого в 2003 г. вышла первая в мире книга, посвященная механосенситивным ионным каналам, авторами которой являлись А.Г.Камкин, В.Н.Ярыгин, И.С.Киселева, — «Механоэлектрическая обратная связь в сердце» (2003). В книге были впервые изложены представления о совершенно новом виде рецепторуправляемых ионных каналов — механоуправляемых, которыми занимаются авторы настоящего издания.

В 2005 г. вышел сборник обзорных статей по проблеме механосенситивности клеток и тканей «Mechanosensitivity in Cells and Tissues» под редакцией А.Камкина и И.Киселевой (2005), в которой 19 ведущих ученых мира — лидеров своих направлений — представили основные работы в этой новой области. А в 2007 г. издательство «Springer» выпустило книгу «Mechanosensitive ion channels» под редакцией А.Г.Камкина и И.С.Киселевой.

В целом, однако, на протяжении последних 20 лет, т.е. всего времени «перестройки», в России не было издано ни одной книги, охватывающей эту важнейшую проблему на современном уровне в тот или иной временной период. Дело дошло до того, что в библиотеках России уже многие годы отсутствуют международные периодические издания, в которых обсуждаются новейшие достижения науки и техники, а доступ к обзорным и оригинальным международным статьям через Интернет определяется суммами, превышающими годовые бюджеты университетов. Эта ситуация сложилась именно в то время, когда физиология и молекулярная биология мембран клеток — проблема, лежащая в основе всех представлений о человеке и в основе всей медицины, достигла небывалого расцвета.

Долгое время работая в ведущих лабораториях западных стран и видя информационное отставание некоторых разделов российской медико-биологической науки, мы приложили максимальные усилия, чтобы изложить хотя бы определенные аспекты современных знаний об электрофизиологии клетки и ее молекулярных механизмах. Мы ограничили нашу задачу тем, что дали лите-

ратурный обзор по проблеме и расставили основные вехи последних достижений в этой области.

Настоящая книга написана по принципу от простого (и даже элементарного) к сложному. Материал представлен с таким расчетом, чтобы ее содержание было абсолютно понятно и интересно как студенту, изучающему физиологию, биофизику, биохимию, молекулярную биологию или фармакологию, так и специалисту, имеющему достаточный опыт работы в области физиологии и молекулярной биологии мембран клеток. В связи с этим часть изложенного в книге материала достаточно хорошо представлена как в зарубежной учебной и научной литературе, так и в отдельных изданиях на русском языке. Однако многие вопросы и дискуссии, связанные с ними, представлены в отечественной литературе впервые и изложены на базе новейших на период написания книги оригинальных работ. Надеемся, что книга заинтересует и профессионалов в этой области.

Все главы книги содержат перечень используемой литературы. Поскольку часть изложенных в книге вопросов общеизвестна для специалистов и представляет интерес только для студентов, а возможно, и для аспирантов, мы привели список литературы без конкретного указания ссылок в тексте на те или иные работы.

Одной из особенностей данной книги являются иллюстрации. Они снабжены исчерпывающими подрисуночными подписями и позволяют наглядно представить все механизмы описываемых процессов.

В целом книга посвящена современным представлениям об электрофизиологии и молекулярной биологии мембран клеток. Рассматриваются и классические аспекты.

Книга написана при поддержке A. von Humboldt-Stiftung (Germany), что авторы отмечают с глубокой благодарностью.

ГЛАВА 1

СТРОЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

1.1. Формирование теории молекулярной организации биологических мембран

Впервые наличие мембраны у клетки, по-видимому, предположил в 1851 г. немецкий физиолог Х. фон Моль (H. von Mohl). Во всяком случае, более ранних упоминаний в литературе о подобном событии не найдено. Х. фон Моль изучал плазмолиз клеток растений и на основе собственных экспериментов пришел к выводу, что клеточные стенки функционируют как мембраны. О существовании мембраны, окружающей биологическую клетку, предположили в 1855 г. К.У. Негели (K.W. Nägeli) и К. Крамер (K. Kramer), которые обнаружили, что неповрежденные клетки могут изменять свой объем при изменении осмотического давления окружающего раствора. Они объяснили это явление существованием полупроницаемой мембраны, что доказал в 1877 г. В. Пфеффер (W. Pfeffer).

Гипотезы о существовании полупроницаемой мембраны были выдвинуты в то время, когда А. Фик (A. Fick) установил классические законы диффузии. Примерно в это время из осадочного ферроцианида меди были созданы искусственные полупроницаемые мембраны, и Я. Вант-Гофф (J. Van't Hoff) и С.А. Аррениус (S.A. Arrhenius, 1887, 1889, 1901) разработали физико-химическую теорию осмотического давления и электролитической диссоциации.

На основе этих уже имеющихся представлений немецкий ученый В. Нернст (W. Nernst), занимающийся физической химией, в 1888 г. вывел уравнения для диффузионного потенциала, а в 1890 г. В. Освальд, также изучавший проблемы физической химии, постулировал возможную роль мембран в биоэлектрических процессах.

Таким образом, была подведена научная база под весьма спорное по тем временам открытие, которое сделал в 1848 г., т.е. значительно раньше постулирования мембраны, Э. Дю Буа-Реймон (E. Du Bois Reymond), сообщив, что между внутренней и наруж-

ной поверхностями кожи лягушки существует разность электрических потенциалов.

Начало развития представлений о молекулярной организации биологической мембраны относится к 1902 г., когда Е. Овертон (E. Overton) на основании того, что вещества, растворимые в липидах, легко проникают через клеточную мембрану, предположил, что она состоит из тонкого слоя липидов.

Дальнейший этап развития представлений о молекулярной организации биологической мембраны относится к 1925 г., когда Е. Гортер (E. Gorter) и Ф. Грендел (F. Grendel) опубликовали результаты работы, выполненной на липидах, экстрагированных из эритроцитов. Е. Гортер и Ф. Грендел обнаружили, что площадь монослоя, занимаемого экстрагированными липидами, вдвое больше суммарной площади эритроцитов, из которых они экстрагированы. На основании этих данных был сделан вывод о том, что липиды в мембране расположены в виде бислоя (двойного слоя). Вместе с тем необходимо отметить элемент случайности в этой теории. Е. Гортер и Ф. Грендел допустили ошибку, экстрагируя эритроциты ацетоном, который не полностью извлекает все липиды. Кроме того, они дали заниженную оценку площади поверхности эритроцитов, используя для ее определения высушенные клетки. В настоящее время очевидно, что если бы опыты были поставлены правильно, они не дали бы того результата, который был реально получен, поскольку часть поверхности эритроцита занята не липидами, а белком. Несмотря на эту критику, представление о двойном липидном слое как о полупроницаемом барьере, окружающем клетку, привлекло внимание биологов того времени и подтолкнуло их к дальнейшим исследованиям.

Наконец, в 1935 г. Дж. Даниэлли (J. F. Danielli) и Х. Давсон (H. Davson) предложили модель молекулярного строения мембраны, которая не претерпела существенных изменений до настоящего времени. Эти ученые обратились к данным, свидетельствующим о том, что в клеточной мембране могут находиться и белковые молекулы, встроенные в липидный бислой. Например, ряд свойств мембран, таких как растяжимость, эластичность и способность к сокращению, можно было объяснить лишь наличием в ее структуре белковых молекул и прежде всего фибриллярных белков. Кроме того, было установлено, что поверхностное натяжение мембран крупных клеток и монослоя липидов на поверхности раздела «липид — вода» сильно отличается. Было высказано предположение, что низкое поверхностное натяжение клеточной мембраны обусловлено наличием белковых структур, входящих в ее состав или покрывающих мембрану. Дальнейшие исследования показали, что добавление к липидам небольшого количества белка резко снижает поверхностное натяжение.

Согласно модели Дж. Даниэлли и Х. Давсона мембрана имеет два слоя молекул фосфолипидов, которые расположены так, что гидрофильные области молекул направлены наружу, а гидрофобные концы — к центру. Поскольку длина липидных молекул равна примерно 3 нм, а толщина монослоя белка не превышает 1 нм, то толщина клеточной мембраны оценивалась примерно в 8 нм. При этом считалось, что на одну молекулу белка приходится приблизительно 75—90 молекул липидов.

Последующие исследования (1957—1962), выполненные с помощью электронного микроскопа Дж. Робертсоном (J. D. Robertson), подтвердили правильность этой модели. До исследований Дж. Робертсона в работах рассматривали только цитоплазматическую мембрану. Он увидел, что внутри клетки существует много структур, окруженных мембранами, и все эти мембраны одинаковы. Им была выдвинута теория ординарной, или унитарной, мембраны. По мнению Дж. Робертсона, основной единицей всех мембранных структур является трехслойная структура толщиной 7,5—9,0 нм. Эта элементарная мембрана состоит из одного бислоя фосфолипидов, покрытого с внутренней стороны (со стороны цитоплазмы) слоем фибриллярного белка, а с наружной — мукополисахаридами или мукопротеидами.

В конце XX в. произошел значительный прогресс в развитии представлений о молекулярной организации биологических мембран. Дальнейшие подтверждения существования двойного фосфолипидного слоя были получены с помощью дифракции рентгеновских лучей — метода, который не требовал химического воздействия на препарат. Хорошие дифракционные картины демонстрировали системы с повторяющимися структурами. Профили электронной плотности ясно показали, что две молекулы фосфолипида расположены «хвост к хвосту», причем электронно-плотные фосфатные группы, разделенные цепями жирных кислот, находятся друг от друга на расстоянии 4 нм.

Результаты, полученные при исследовании расположения полярных голов фосфолипидов методом ядерного магнитного резонанса, также подтверждали гипотезу двойного слоя.

На рис. 1.1 приведена современная схема строения цитоплазматической мембраны, окружающей клетку. Бислой фосфолипидов представляет собой основную структуру мембраны клетки и состоит из двух листков молекул фосфолипидов. В него включены нелипидные соединения, представленные интегральными и поверхностными белками. Углеводные компоненты, связанные с белками, представляют собой гликопротеины, а связанные с липидами являются гликолипидами.

Гидрофильные области молекул фосфолипидов содержат полярные группы, взаимодействующие с молекулами воды и формирующие гидратные оболочки. На полярных группах молекул

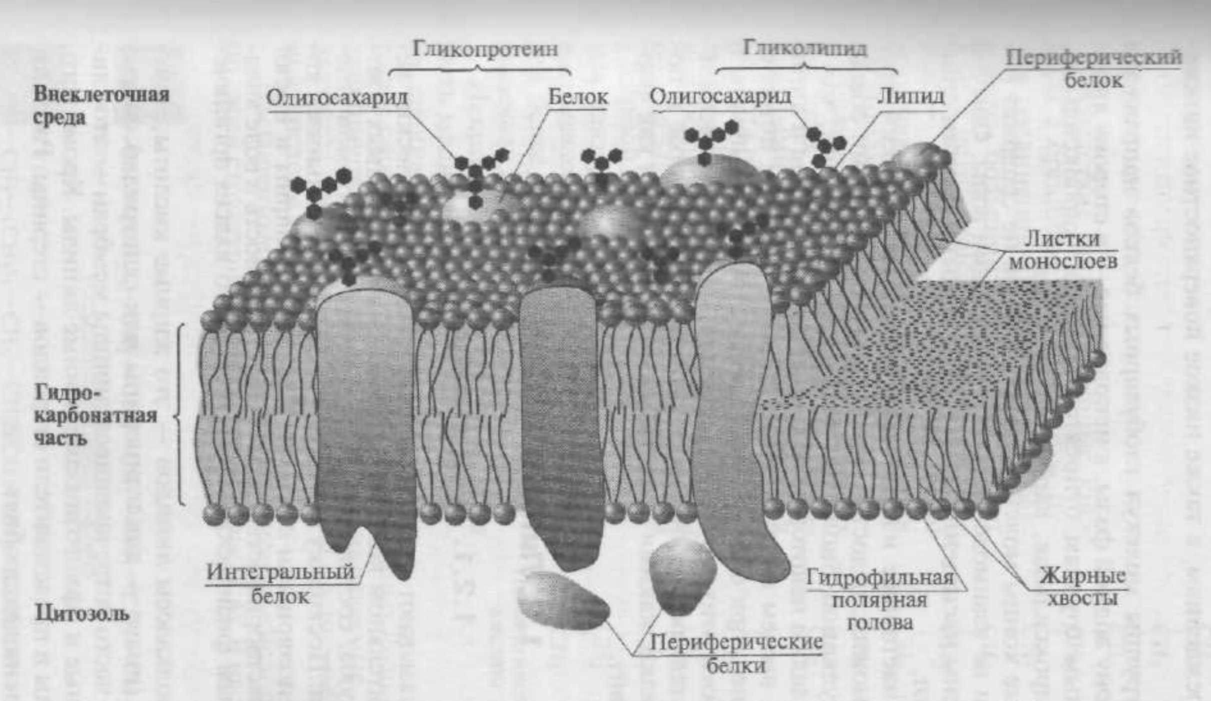


Рис. 1.1. Структура биологической мембраны. Указаны компоненты, входящие в ее состав. К боковым цепям определенных аминокислот (например, серина или треонина) белковой молекулы могут присоединяться один или более моносахаридов, при этом образуется класс белков, называемых гликопротеинами

фосфолипидов мембраны адсорбированы белковые цепочки, которые в форме глобул покрывают двойной слой фосфолипидов с обеих сторон, придавая ему эластичность и устойчивость к механическим повреждениям, а также низкое поверхностное натяжение.

Полярные группы молекул глобулярных белков направлены наружу, в сторону водной фазы, а неполярные — в сторону липидов. К полярным группам относятся аминная, карбоксильная, фосфатная, гидроксильная, карбонильная и др.

Гидрофобные концы молекул фосфолипидов не содержат полярных групп и не взаимодействуют с молекулами воды. Обычно они представлены насыщенными углеводородными цепями органических кислот.

Поскольку настоящее издание рассчитано на широкий круг читателей, возможно, недостаточно знакомых с основами современной молекулярной биологии, биохимии, биофизики, мы с самого начала дадим некоторые основные представления о липидах и белках и введем определенные понятия, которые потребуются нам позднее, при описании основных структур мембраны и принципов работы этих структур. Например, мы коротко рассмотрим, что представляют собой фосфолипиды, интегральные и поверхностные белки, какими свойствами они обладают и как формируют мембрану.

1.2. Липиды мембран

1.2.1. Типы липидов

Липидами называют не растворимые в воде органические вещества, в значительном количестве содержащиеся в живых клетках. Это молекулы, состоящие преимущественно из атомов углерода и водорода. Поскольку эти атомы связаны нейтральными ковалентными неполярными связями, липиды неполярны и имеют очень низкую растворимость в воде. Нерастворимость в воде является характерным физическим свойством этого класса органических молекул.

Основные подклассы липидов — это жирные кислоты, нейтральные жиры (иначе — ацилглицерины или глицериды), стероиды. Наиболее часто встречающиеся липиды мембран — это глицеринзамещенные и сфингозинзамещенные липиды. Кроме того, это гликолипиды и представители стероидов — стерины. Рассмотрим эти соединения подробнее.

Жирные кислоты. Молекулы жирных кислот представляют собой длинные углеводородные цепи с концевой карбоксильной группой. Типичный пример жирных кислот представлен на рис. 1.2.

Рис. 1.2. Примеры жирных кислот

Пальмитиновая кислота

Олеиновая кислота

Вследствие того что жирные кислоты в организме синтезируются путем соединения двууглеродных фрагментов, большинство жирных кислот имеет четное число углеродных атомов — от 14 до 22. Наиболее часто встречаются жирные кислоты с 16 или 18 атомами углерода.

Если все атомы углерода в жирных кислотах связаны одинарными ковалентными связями, то такая жирная кислота называется *насыщенной*. Некоторые жирные кислоты содержат одну или больше двойных связей, и тогда они называются *ненасыщенными*. Если у жирной кислоты имеется одна двойная связь, то она называется *мононенасыщенной* кислотой. Когда таких связей более одной, говорят о *полиненасыщенной* жирной кислоте (рис. 1.3).

Некоторые жирные кислоты могут быть модифицированы с образованием специального класса молекул, которые способны регулировать ряд клеточных функций. Такие модифицированные жирные кислоты, называемые *эйкозаноидами*, являются производными 20-углеродной полиненасыщенной жирной кислоты (арахидоновой).

Насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты различаются по своей структурной конфигурации (рис. 1.4). В насыщенных жир-

$HO{-}C({=}O){-}CH_2{-}(CH_2)_5{-}CH_2{-}CH_2{-}CH_2{-}CH_2{-}CH_2{-}CH_2{-}CH_2{-}(CH_2)_3{-}$

Насыщенная жирная кислота

$HO{-}C({=}O){-}CH_2{-}(CH_2)_5{-}CH_2{-}CH{=}CH{-}CH_2{-}CH{=}CH{-}CH_2{-}(CH_2)_3{-}C$

Полиненасыщенная жирная кислота

Рис. 1.3. Ненасыщенная и полиненасыщенная жирные кислоты

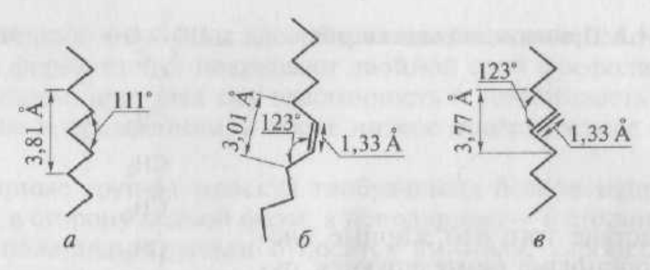


Рис. 1.4. Конфигурация связей жирных кислот:

а — насыщенных; *б*, *в* — ненасыщенных, соответственно *цис*- и *транс*-двойная связь

ных кислотах углеводородный хвост может принимать множество конформаций вследствие свободы вращения вокруг каждой одинарной связи (рис. 1.4, *а*), однако наиболее вероятной конфигурацией является вытянутая форма как энергетически наиболее выгодная.

В ненасыщенных жирных кислотах невозможно вращение вокруг двойной связи, и это обусловливает жесткий изгиб углеводородной цепи. В ненасыщенных жирных кислотах *цис*-конфигурация двойной связи создает изгиб алифатической цепи под углом примерно 30° (рис. 1.4, *б*). При *транс*-форме двойной связи конформация углеводородной цепи мало отличается от конформации насыщенной цепи (рис. 1.4, *в*).

Нейтральные жиры (ацилглицерины). Глицериновые эфиры жирных кислот называются нейтральными жирами или ацилглицеринами или глицеридами. Они составляют главный компонент жиров, запасаемых в клетках. Структурной основой этих липидов является замещенный трехатомный спирт глицерин (рис. 1.5).

Если жирными кислотами этерифицированы все три гидроксильные группы глицерина, то такое соединение называется *триацилглицерин*. Каждая из трех гидроксильных групп глицерина связывается с карбоксильной группой жирной кислоты с высвобождением воды. Три жирные кислоты в молекуле триацилглицерина бывают разными; таким образом, разные жиры могут быть образованы жирными кислотами с цепочками разной длины и разной степенью насыщенности. Жир животных обычно содержит в основном насыщенные жирные кислоты, в то время как жиры растений — преимущественно ненасыщенные жирные кислоты. Гидролиз триацилглицеринов приводит к освобождению жирных кислот от глицерина, а эти продукты могут расщепляться дальше с освобождением энергии, необходимой для функционирования клеток. Триацилглицерины представляют собой основную массу природных нейтральных жиров. Кроме триацилглицеринов встречаются диацилглицерины и моноацилглицерины.

Глицерин

```
     H
     |
H—C—OH   1
     |
H—C—OH   2
     |
H—C—OH   3
     |
     H
```

1,2-Диацилглицерин

```
     H
     |
H—C—O—C—R1
     |     ||
     |     O
     |
H—C—O—C—R2
     |     ||
     |     O
     |
H—C—OH
     |
     H
```

1-Моноацилглицерин

```
     H
     |
H—C—O—C—R1
     |     ||
     |     O
     |
H—C—OH
     |
H—C—OH
     |
     H
```

Триацилглицерин

```
     H
     |
H—C—O—C—R1
     |     ||
     |     O
     |
H—C—O—C—R2
     |     ||
     |     O
     |
H—C—O—C—R3
     |     ||
     H     O
```

Рис. 1.5. Нейтральные жиры. Положение жирных кислот отмечены как R_1, R_2 и R_3

Фосфоглицериды. Структурной основой производных глицерина является замещенный трехатомный спирт глицерин. Фосфолипиды мембран — это преимущественно фосфоглицериды (рис. 1.6). Интересно, что эти соединения в организме встречаются практически только в биологических мембранах. В фосфоглицеридах одна из первичных гидроксильных групп глицерина (группа 3 на рис. 1.6) этерифицирована не жирной, а фосфорной кислотой. Другими словами, основой для их построения является не глицерин, а глицерофосфорная кислота. Если в положении 3 у глицерина находится остаток фосфорной кислоты, то соответствующее соединение называют *фосфатидиловой кислотой*.

Кроме того, к этому фосфату в ряде случаев присоединяется небольшая полярная ионизированная азотсодержащая молекула (рис. 1.7), как, например, у фосфатидилсерина и фосфатидилхолина (см.ниже). Эти группы составляют полярную (гидрофильную) область на одном конце фосфолипида. Две другие гидроксильные группы глицерина (группы 1 и 2 на рис. 1.6 и 1.7) представляют собой остатки жирных кислот и обеспечивают образование неполярного (гидрофобного) участка на противоположном конце молекулы.

Полярная голова

Неполярные хвосты

Рис. 1.6. Общая структура фосфоглицеридов. В положении 2 обычно находится ненасыщенная жирная кислота. Структура демонстрирует амфипатическую природу соединения

Таким образом, молекулы всех фосфоглицеридов содержат полярную голову и два неполярных углеводородных хвоста, поэтому они называются *амфипатическими*, т. е. совмещающими свойства и гидрофильности, и гидрофобности. В воде они организуются в кластеры с полярными концами, которые притягивают молекулы воды.

Фосфоглицериды отличаются друг от друга главным образом по X-группе полярной головы молекулы (см. рис. 1.6). Наиболее

Фосфолипид (фосфатидилхолин)

Рис. 1.7. К фосфату присоединена полярная ионизированная азотсодержащая молекула

простым типом фосфоглицеридов является фосфатидная кислота, не имеющая Х-группы. В клетках она содержится в малом количестве и является промежуточным продуктом в биосинтезе других фосфоглицеридов. Наиболее часто встречающиеся фосфоглицериды и их структура приведены на рис. 1.8.

В организме человека и животных в наибольшем количестве встречаются такие фосфоглицериды, как фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин. Они метаболически связаны друг с другом и содержат в качестве Х-группы аминоспирты этаноламин (остаток фосфоэтаноламина) и холин (остаток фосфохолина). В фосфатидилсерине фосфорная кислота этерифицирована гидроксильной группой серина фосфосерина. В фосфатидилинозите Х-группой служит шестиуглеродный сахароспирт инозит (остаток фосфорного эфира инозита). В фосфатидилглицерине роль Х-группы играет остаток эфира глицерофосфата. Близок к нему более сложный липид кардиолипин, представляющий собой дифосфатидилглицерин, в котором роль Х-группы играет фосфатидилглицерофосфат.

Роль полярной Х-группы фосфатидов может играть также молекула сахара. Эти гликофосфоглицериды, или фосфатидилсахара, обнаружены в растениях и микроорганизмах. Их не следует путать с гликолипидами, в молекуле которых тоже находится сахар, но отсутствует фосфорная кислота.

Сфингозинзамещенные липиды. Структурной основой сфингозинзамещенных липидов является аминоспирт сфингозин. Сфинголипиды обнаружены в мембранах растительных и животных клеток; особенно богата ими нервная ткань, в частности головной мозг. В жировых отложениях сфинголипидов очень немного. При гидролизе сфинголипиды дают одну молекулу жирной кислоты, одну молекулу ненасыщенного аминоспирта сфингозина или его насыщенного аналога дигидросфингозина (рис. 1.9), одну молекулу фосфорной кислоты и одну молекулу спирта (*X—OH*). Глицерина сфинголипиды не содержат.

Самым распространенным сфинголипидом является сфингомиелин, содержащий в качестве Х-группы холин. Для сфингомиелина, так же как и для всех других сфинголипидов, характерно то, что одним из его углеводородных хвостов служит длинная алифатическая цепь сфингозина, а другим — этерифицированная жирная кислота. Таким образом, в отношении конформации сфинголипиды весьма сходны с фосфоглицеридами в том смысле, что их молекулы также содержат полярную голову и два неполярных хвоста.

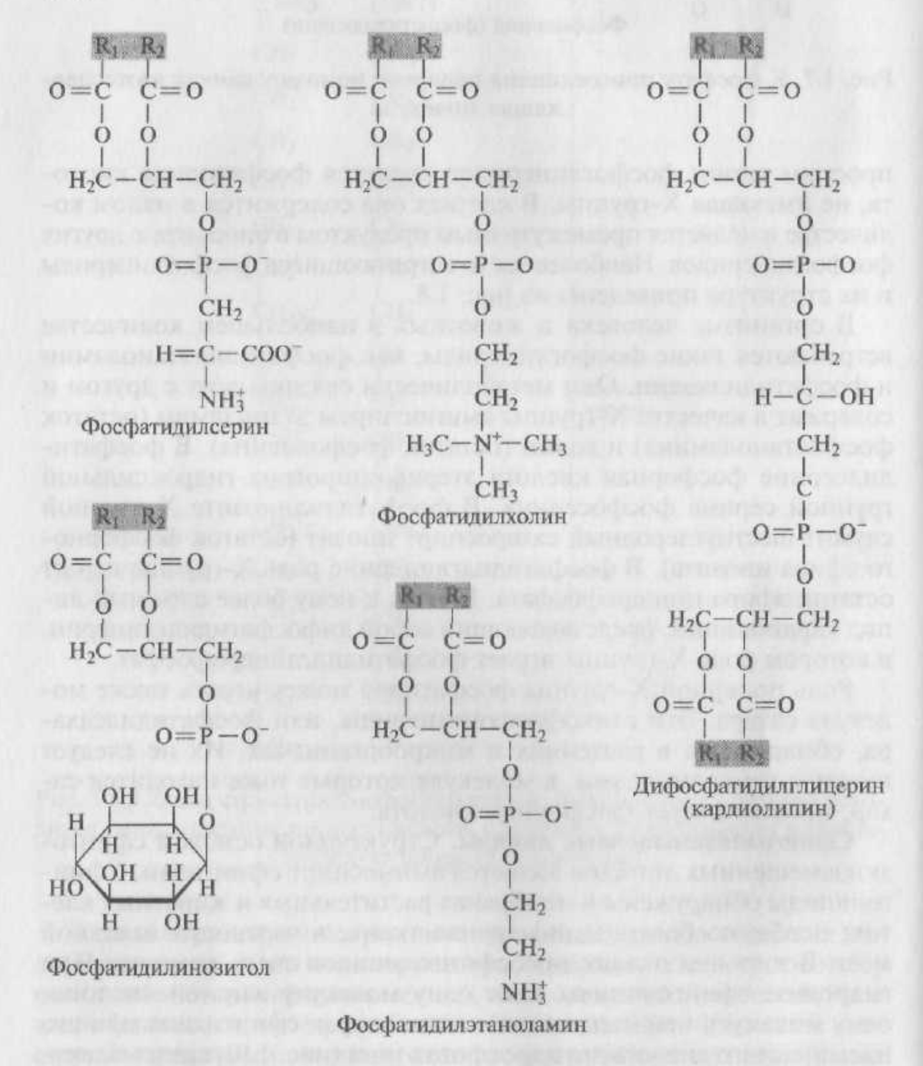


Рис. 1.8. Структура фосфоглицеридов, найденных в мембране клетки. Положение жирных кислот отмечено как R_1 и R_2

	Сфингозин	Дигидросфингозин
Полярная голова	CH_2OH	CH_2OH
	$H-C-NH_2$	$H-C-NH_2$
	$H-C-OH$	$H-C-OH$
Неполярный хвост	CH	CH_2
	‖	
	HC	CH_2
	CH_2	CH_2
	CH_2	CH_2
	CH_2	CH_2
	CH_2	CH_2
	CH_2	CH_2
	CH_2	CH_2
	CH_2	CH_2
	CH_2	CH_2
	CH_2	CH_2
	CH_2	CH_2
	CH_2	CH_2
	CH_2	CH_2
	CH_3	CH_3

Рис. 1.9. Сфингозин (систематическое название — 4-сфингенин) и дигидросфингозин (систематическое название — сфинганин). В молекуле сфингозина двойная связь находится в *транс*-конфигурации

У гликолипидов голову молекулы образуют полярные гидрофильные углеводные группы, чаще всего D-галактоза, однако в отличие от сфинголипидов гликолипиды не содержат фосфорной кислоты. Простейшими гликолипидами являются *гликозилдиацилглицерины*, обнаруженные в растениях и микроорганизмах. Другая группа, *цереброзиды* (рис. 1.10), может быть отнесена как к гликолипидам, так и к сфинголипидам, поскольку эти соединения содержат и сахар, и сфингозин. Особенно велико содержание цереброзидов в мембранах нервных клеток, в частности в миелиновой оболочке. Обнаруженные в цереброзидах жирные кислоты необычны в том отношении, что они содержат 24 атома углерода. Чаще всего встречаются нервоновая, цереброновая и лигноцериновая кислоты. Жирнокислотный эфир сфингозина, не содержащий сахара, известен как *церамид*.

Сфингомиелин

Моногалактозилдиацилглицерин

Цереброзид

Полярная голова

Неполярные хвосты

Лигноцерановая кислота

(β)

Рис. 1.10. Структурные формулы сфингомиелина, моногалактозилдиацилглицерина и цереброзида

Стероиды. Стероиды резко отличаются по структуре от молекул других подклассов липидов. Стероиды являются производными пергидроциклопентанфенантренового ядра (рис. 1.11), содержащего три конденсированных циклогексановых кольца, соединенных друг с другом.

Рис. 1.11 Пергидроциклопентанфенантреновое ядро

К этим структурам может быть присоединено несколько гидроксильных полярных групп, но число их недостаточно, чтобы сделать стероид водорастворимым.

Среди важных природных стероидов можно назвать желчные кислоты, мужские и женские половые гормоны, гормоны надпочечников, а также некоторые стероиды с высокой биологической активностью, к которым относятся, в частности, некоторые яды. В клетках эти соединения присутствуют большей частью в следовых количествах, и только представители одного класса стероидов, а именно стерины, составляют исключение. Стеринами клетки очень богаты.

Стерины содержат спиртовую гидроксильную группу при С-3 и разветвленную алифатическую цепь из восьми или большего числа атомов углерода при С-17. Они существуют либо в виде свободных спиртов, либо в виде эфиров, у которых гидроксильная группа при С-3 этерифицирована жирной кислотой с длинной цепью (рис. 1.12).

Рис. 1.12. Холестерин

Примерами стероидов являются: холестерин, кортизол (синтезируется в надпочечниках), женские (эстрогены) и мужские (тестостерон) половые гормоны, секретируемые гонадами. Наиболее распространен холестерин (см. рис. 1.12), который содержится в организме как в свободной, так и в этерифицированной форме. Холестерин входит в состав мембраны. Холестерином богаты плазматические мембраны всех животных клеток. В меньшем количестве он содержится в мембранах митохондрий и эндоплазматического ретикулума.

1.2.2. Текучесть бислоя липидов и вращательная диффузия молекул

В физиологических условиях мембраны обладают динамическими свойствами. Липидный бислой по существу является вязкой жидкостью и характеризуется текучестью. Текучесть представляет собой макроскопическую характеристику всего липидного бислоя; ее величина обратна вязкости. Поскольку липидный бислой обладает текучестью, он, следовательно, имеет низкую вязкость. В зависимости от температуры и химического состава мембраны текучесть может быть высокой или низкой. Текучесть липидного бислоя у теплокровных животных имеет небольшое значение, поскольку температура внутренней среды организма более или менее постоянна, однако у холоднокровных животных текучесть мембраны имеет принципиальное значение, поскольку при понижении температуры вязкость липидного бислоя увеличивается и, следовательно, текучесть уменьшается. Такие изменения динамических свойств мембраны, наряду с рядом других приводят к тому, что при низких температурах жизнь холоднокровных животных замирает. Вместе с тем вязкость фосфолипидного бислоя обусловлена двумя видами подвижности на уровне молекул фосфолипидов, которые обладают двумя видами движений: внутримолекулярным и межмолекулярным.

К внутримолекулярной подвижности относится относительная подвижность цепей жирных кислот и участков полярной головки, связанная с гибкостью цепей. Гибкость, в свою очередь, связана с возможностью вращения химических группировок относительно одинарной связи. Это так называемая *конформационная подвижность*.

Вращательная диффузия — это вращение молекулы вокруг своей продольной (длинной) оси, поскольку в вязкой среде «веретено» в плоскости мембраны легче вращается вокруг продольной оси, чем вокруг поперечной.

Вращение вокруг поперечной (короткой) оси теоретически возможно, но в этом случае центр вращения, присущий фосфо-

липидам, находится близко к поверхности. Вращение происходит как бы около «шеи» молекулы. В этой области молекулы стиснуты и движение ограничено. Хвосты в этом случае могут совершать маятникообразные движения, но центр вращения будет находиться вверху. Именно поэтому центральная часть бислоя обладает большей текучестью, чем области цепей жирных кислот, которые расположены ближе к полярной голове молекулы фосфолипида.

Межмолекулярное движение представляет собой латеральную диффузию целых фосфолипидных молекул и, по-видимому, происходит путем обмена двух молекул липидов местами.

1.3. Белки мембран

1.3.1. Первичная структура белка

В целом любые белки состоят из углерода, водорода, кислорода, азота и небольших количеств других элементов. Эти макромолекулы образованы путем соединения вместе большого числа небольших мономеров, в результате чего образуются длинные цепи.

Мономерами белков являются аминокислоты. Таким образом, белки представляют собой полимеры, состоящие из аминокислот. Каждая аминокислота, за исключением пролина, имеет свободную аминогруппу ($-NH_2$) и свободную карбоксильную группу ($-COOH$), связанные с концевым атомом углерода в молекуле (с α-углеродным атомом).

$$\begin{array}{c} \mathrm{H} \\ | \\ \mathrm{R{-}C{-}COOH} \\ | \\ \mathrm{NH_2} \end{array}$$

Третья связь этого концевого углерода — это связь с водородом, а четвертая — с остатком молекулы, которая является боковой цепью аминокислоты (R-группа в формуле). Эти боковые цепи относительно короткие и насчитывают от одного атома водорода до девяти атомов углеродов.

Белки состоят из одного и того же набора 20 разных аминокислот с соответствующими 20 различными боковыми цепочками.

Боковые цепи могут быть неполярными (восемь аминокислот), полярными (семь аминокислот) или ионизированными (пять аминокислот) (рис. 1.13).

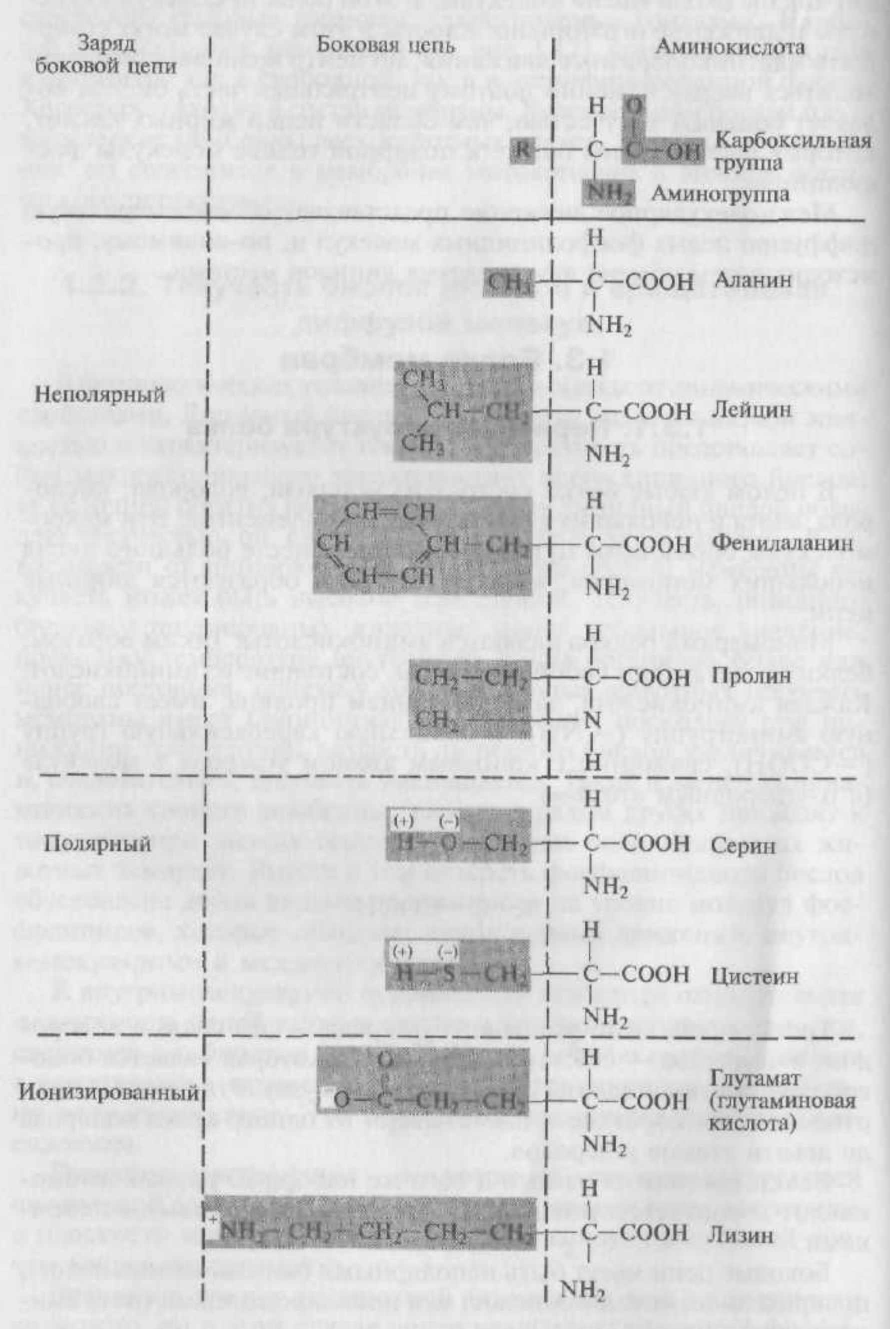


Рис. 1.13. Структура 8 из 20 аминокислот, обнаруженных в белках

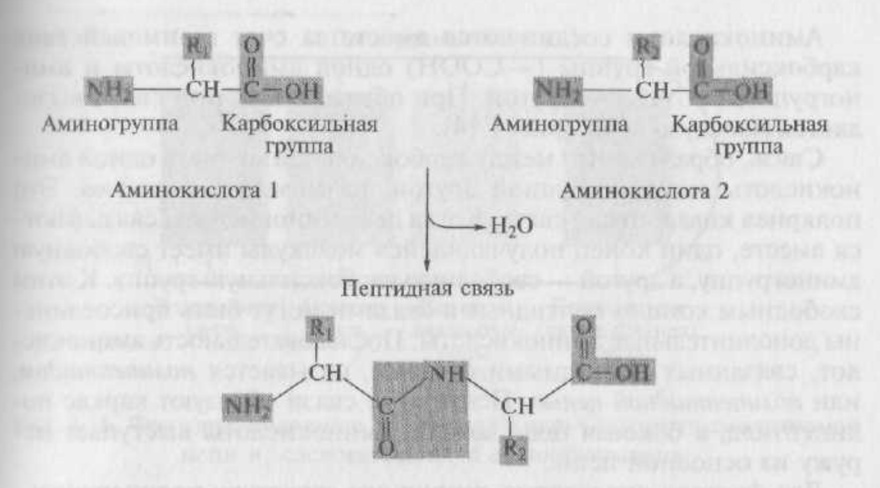


Рис. 1.14. Связывание аминокислот в полипептиде

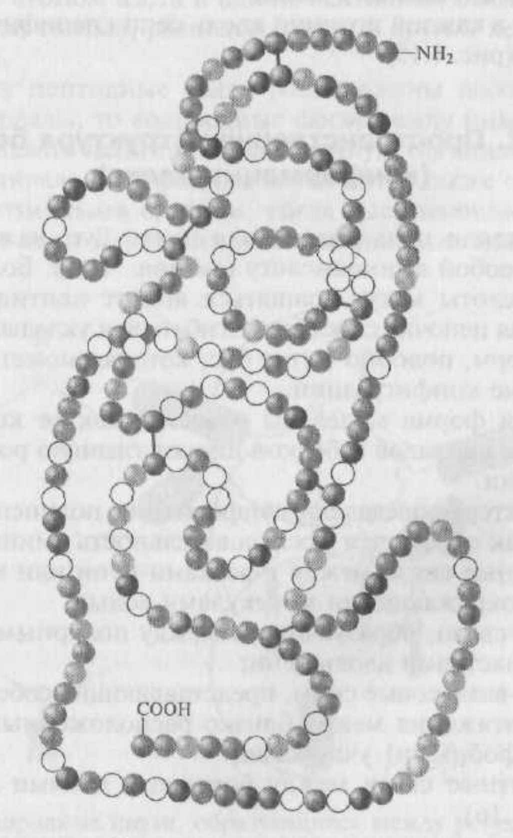


Рис. 1.15. Полипептид. Линиями представлены ковалентные дисульфидные связи между боковыми цепями цистеина

Аминокислоты соединяются вместе за счет взаимодействия карбоксильной группы (—COOH) одной аминокислоты и аминогруппы (—NH_2) — другой. При образовании этой связи выделяется молекула воды (рис. 1.14).

Связь, образованная между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминогруппой другой, называется *пептидной*. Это полярная ковалентная связь. Когда две аминокислоты связываются вместе, один конец получающейся молекулы имеет свободную аминогруппу, а другой — свободную карбоксильную группу. К этим свободным концам пептидными связями могут быть присоединены дополнительные аминокислоты. Последовательность аминокислот, связанных пептидными связями, называется *полипептидом*, или *полипептидной цепью*. Пептидные связи образуют каркас полипептида, а боковая цепь каждой аминокислоты выступает наружу из основной цепи.

Два фактора определяют первичную структуру полипептида:

1) число аминокислот в цепи;

2) наличие в каждой позиции вдоль цепи специфического типа аминокислот (рис. 1.15).

1.3.2. Пространственная структура белка (конформация белка)

Полипептидная цепь аналогична нитке бус: каждая бусинка представляет собой аминокислоту (см. рис. 1.15). Более того, так как аминокислоты могут вращаться вокруг пептидных связей, полипептидная цепочка способна изгибаться и укладываться в виде различных форм, подобно нитке бус, которая может быть закручена во многие конфигурации.

Трехмерная форма молекулы известна как ее конформация. Конформации пептидов и белков играют главную роль в их функционировании.

Четыре фактора определяют конформацию полипептидной цепи после того, как образуется последовательность аминокислот:

1) водородные связи между участками цепи или между участками цепи и окружающими молекулами воды;

2) ионные связи, образующиеся между полярными и ионизированными участками вдоль цепи;

3) ван-дер-ваальсовые силы, представляющие собой очень слабые силы притяжения между близко расположенными неполярными (гидрофобными) участками;

4) ковалентные связи между боковыми цепями двух аминокислот (рис. 1.16).

Примером притяжения разных участков полипептидной цепи является водородная связь, которая образуется между водородом,

Рис. 1.16. Факторы, вносящие свой вклад в скручивание полипептидной цепи и, следовательно, в ее конформацию

связанным с атомом азота в одной пептидной связи, и кислородом с двойной связью, расположенным в другой пептидной связи (рис. 1.17).

Поскольку пептидные связи расположены вдоль цепи через равные интервалы, то водородные связи между ними имеют тенденцию придавать цепи пространственную организацию, известную как α-спираль. Водородные связи могут также образовываться между пептидными связями, когда выступающие участки полипептидной цепи идут примерно параллельно одна другой, об-

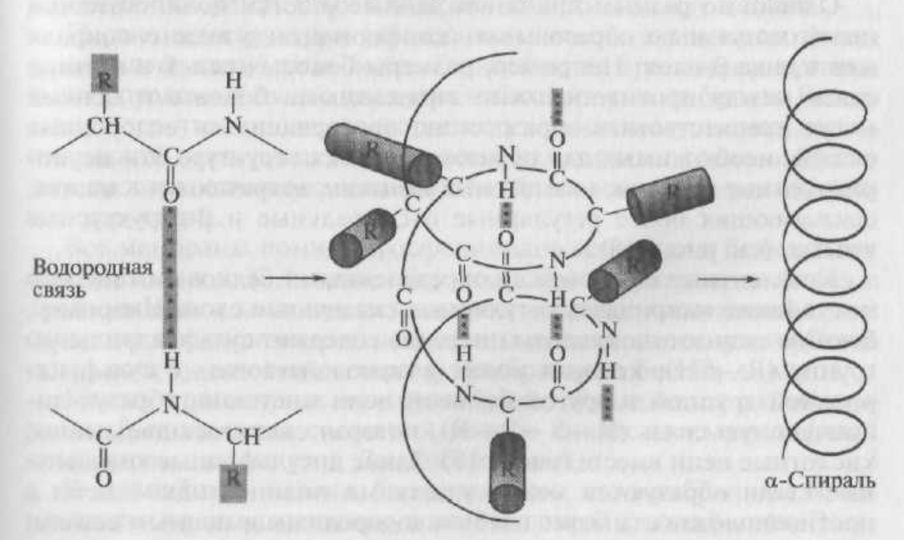


Рис. 1.17. Водородные связи, образующиеся между регулярно расположенными пептидными связями: могут привести к формированию спиральной конформации полипептидной цепи

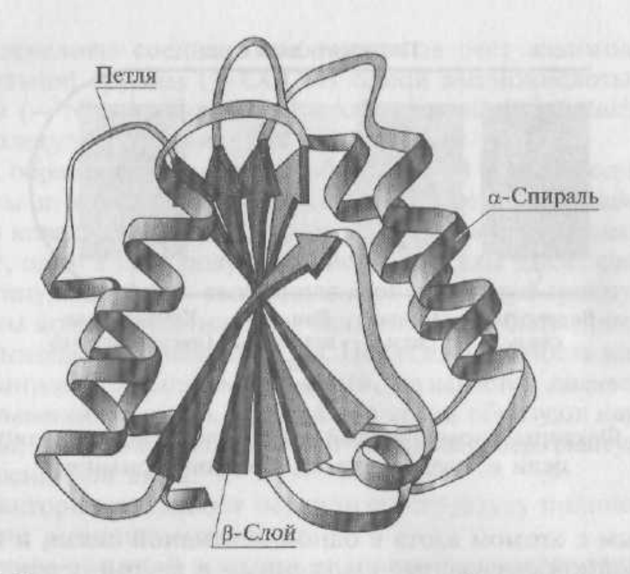


Рис. 1.18. Расположение каркаса полипептидной цепи в пространстве. Спиральные участки закручены, β-слои, образованные из параллельных цепей, показаны относительно прямыми стрелами; петли соединяют различные спирали и β-слои

разуя сравнительно прямые структуры типа складчатого слоя, которые известны как β-слой (рис. 1.18).

Однако по разным причинам данные участки полипептидных цепей могут и не образовывать конформации в виде α-спирали или в виде β-слоя. Например, размеры боковых цепей и ионные связи между противоположно заряженными боковыми цепями могут препятствовать образованию повторяющихся водородных связей, необходимых для образования этих структур. Эти неупорядоченные участки, называемые *петлями*, встречаются в местах, связывающих более регулярные α-спиральные и β-структурные участки (см. рис. 1.18).

Ковалентные связи между определенными белковыми цепями могут также искривлять регулярные складчатые слои. Например, боковая цепь аминокислоты цистеина содержит сульфгидрильную группу (R—SH), которая может взаимодействовать с сульфгидрильной группой в другой боковой цепи цистеина, образуя дисульфидную связь (R—S—S—R), которая связывает две аминокислотные цепи вместе (рис. 1.19). Такие дисульфидные ковалентные связи образуются между участками полипептидной цепи в противоположность более слабым водородным и ионным связям, которые легче разрушаются. Эти же связи вовлечены и в другие межмолекулярные взаимодействия, которые будут описаны далее.

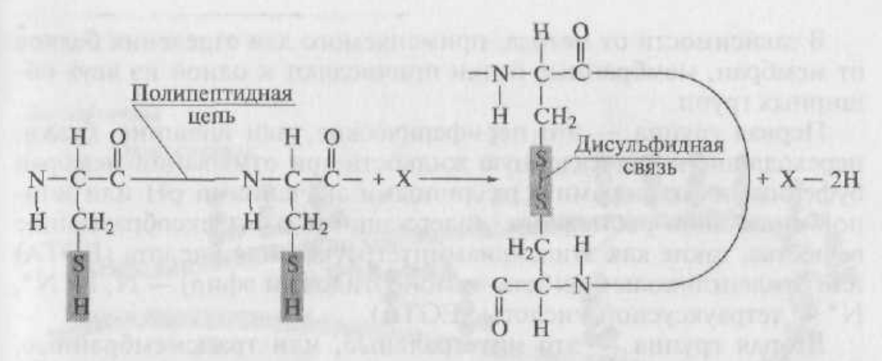


Рис. 1.19. Образование дисульфидных связей между боковыми цепями двух цистеиновых остатков соединяет два участка полипептида. При образовании дисульфидной связи атомы водорода сульфгидрильных групп цистеина переносятся на другую молекулу X

Большинство белков состоят не из одной, а из нескольких полипептидных цепей и известны как мультимерные (олигомерные) белки. Те же факторы, которые влияют на конформацию одного полипептида, определяют взаимодействие между полипептидами в олигомерных белках.

Таким образом, цепи могут поддерживаться вместе благодаря взаимодействию между разными ионизированными, полярными и неполярными боковыми радикалами цепи, а также за счет образования дисульфидных ковалентных связей между цепями.

Первичная структура (последовательность аминокислот) подавляющего количества белков известна, но трехмерная организация определена только для очень небольшого числа белков. Вследствие того что многие факторы могут изменять упаковку полипептидной цепи, в настоящее время невозможно точно предсказать пространственную организацию белка на основе его первичной структуры.

Все мембраны помимо фосфолипидов содержат и белки. Хотя Дж. Даниэлли и Х. Давсон, обсуждая способ связывания белка с двойным слоем липидов, использовали термин «мозаичный», они отвергли предположение о том, что пленка растянутого белка покрывает ту или иную сторону мембранного бислоя липидов.

Мысль о растянутых молекулах белка, находящихся в конфигурации β-слоя, стала составной частью гипотезы «элементарной мембраны», выдвинутой Дж. Робертсоном.

В дальнейшем, однако, было показано, что мембранный белок находится преимущественно в виде α-спирали, а не β-слоя. В настоящее время признано, что существуют белки, связанные с обеими сторонами мембраны и пронизывающие насквозь двойной липидный слой.

В зависимости от метода, применяемого для отделения белков от мембран, мембранные белки причисляют к одной из двух обширных групп.

Первая группа — это периферические, или внешние, белки, переходящие в надосадочную жидкость при отмывании мембран буферными растворами с различными значениями pH или ионной силы либо растворами, содержащими комплексобразующие вещества, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) или этиленгликоль-бис(бета-аммоноэтиловый эфир) — N, N, N″, N″ — тетрауксусной кислоты (EGTA).

Вторая группа — это интегральные, или трансмембранные, белки, которые сохраняют связь с мембранами и после проведения указанных операций, поэтому для их освобождения необходимо сначала разрушить структуру фосфолипидного двойного слоя.

1.3.3. Интегральные мембранные белки

В 1972 г. С. Сингер (S. Singer) и Г. Николсон (G. Nicolson) впервые описали интегральные белки. В настоящее время накоплено множество данных, полученных на молекулярном уровне, из которых следует, что эти белки чрезвычайно разнообразны по своей структуре.

Интегральные белки асимметрично распределены в бислое. Подавляющее большинство интегральных белков многократно пересекают липидный бислой — это зигзагообразные белки. Они выполняют множество различных функций. Интегральные белки выступают в роли гидролитических ферментов, рецепторов клеточной поверхности, окислительно-восстановительных компонентов транспортной системы электронов и в качестве специфических белков-переносчиков.

Известно, что в гликозилированных интегральных белках область, содержащая углеводы, расположена либо на клеточной поверхности, либо внутри полости эндоплазматического ретикулума или комплекса Гольджи.

Многие известные интегральные белки содержат в своих полипептидных цепях последовательности гидрофобных аминокислот (рис. 1.20), однако некоторые из них связаны с липидным бислоем по иному механизму. Часть интегральных белков ковалентно связана с липидами.

В настоящее время большой интерес исследователей вызывает изучение конформации белков мембран. Многие важные процессы сопровождаются или вызываются изменением способа укладки полипептидной цепи, т. е. изменением конформации белковых молекул в мембранах.

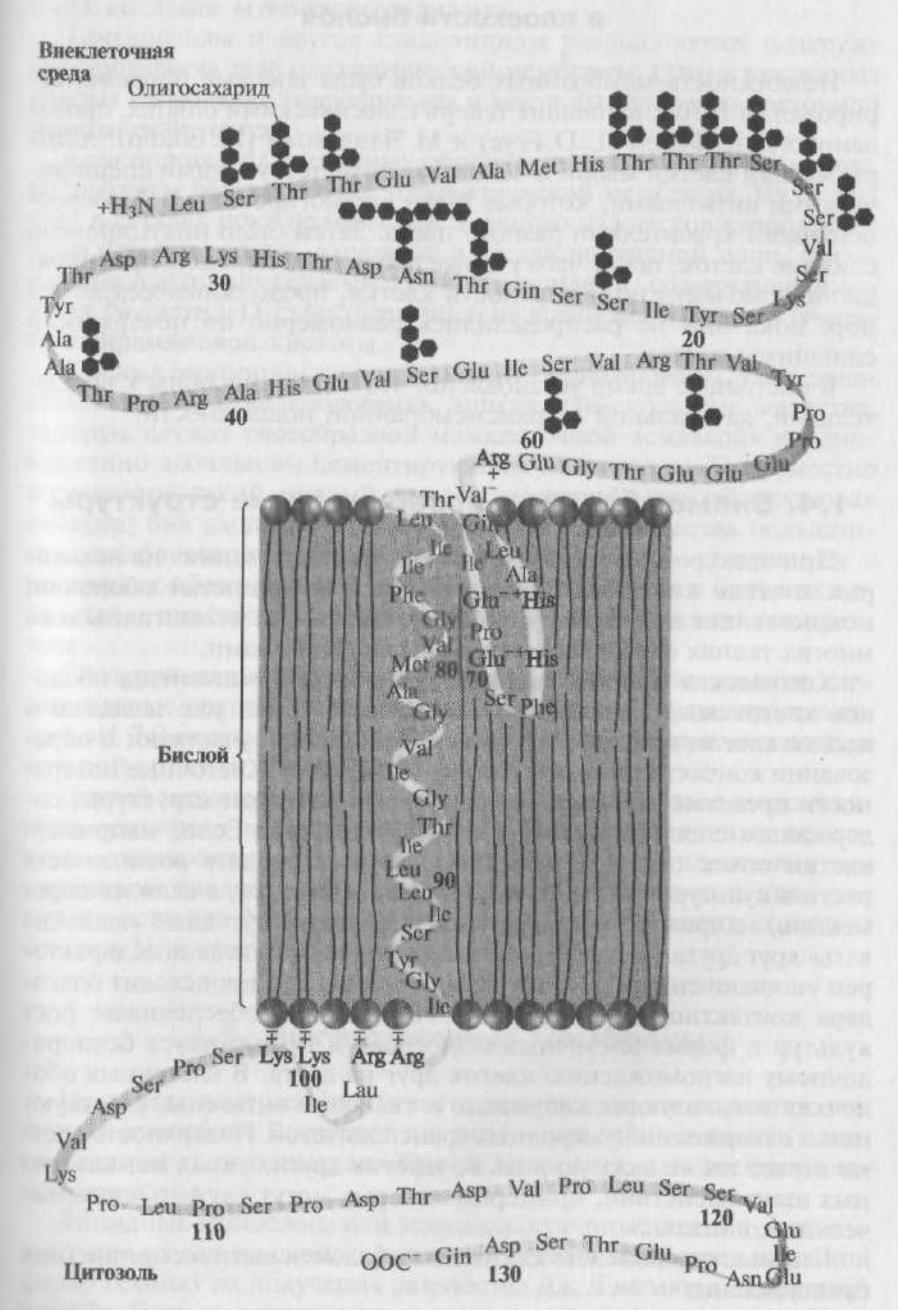


Рис. 1.20. Трансмембранный белок, содержащий длинный фрагмент гидрофобных аминокислот, встроенных в фосфолипидный бислой

1.3.4. Подвижность мембранных белков в плоскости бислоя

Подвижность мембранных белков была впервые продемонстрирована в 1970 г. в ставших теперь классическими опытах, проведенных Л.Д. Фраем (L. D. Frye) и М. Эдидиным (M. Edidin). Авторы метили клетки мыши и человека соответствующими специфическими антителами, которые были конъюгированы с флюоресцентными красителями разного цвета. Затем было индуцировано слияние клеток, после чего ученые наблюдали перемещение окрашенных молекул по поверхности клетки, продолжавшееся до тех пор, пока они не распределились равномерно по поверхности слившихся клеток.

В настоящее время установлено, что белки способны к вращательной, латеральной и трансмембранной подвижности.

1.4. Внемембранные поверхностные структуры

При электронно-микроскопических исследованиях на некоторых клетках животных обнаруживаются волокнистые оболочки, покрывающие клеточную мембрану. Они мягки и эластичны и во многих тканях обладают адгезионными свойствами.

Химическая природа некоторых главных компонентов оболочек клеток млекопитающих в настоящее время уже известна и продолжает интенсивно изучаться, так как они участвуют в образовании контактов между соседними клетками. Клеточные поверхности представляют собой высокоорганизованные структуры, содержащие специфические центры узнавания. Если, например, клетки почек отделить друг от друга и затем дать возможность расти в культуре ткани, то они снова соединятся, а если их перемешать, например, с клетками печени, то будут даже «выискивать» друг друга. Для нормальных клеток млекопитающих характерен упорядоченный рост в культуре ткани. Это происходит благодаря контактному торможению. Именно оно обеспечивает рост культур в форме клеточных монослоев и препятствует беспорядочному нагромождению клеток друг на друга. В клеточных оболочках локализуются клеточные и тканевые антигены, участвующие в отторжении чужеродных трансплантатов. Поверхность клетки играет также важную роль во многих других типах межклеточных взаимодействий, примером которых могут служить синаптические контакты.

Главные компоненты клеточных оболочек высших организмов представлены:

1) углеводными компонентами гликолипидов, в частности цереброзидов и ганглиозидов;

2) гликопротеидами;

3) кислыми мукополисахаридами.

Ганглиозиды и другие гликолипиды располагаются в наружном липидном слое плазматической мембраны. Олигосахаридные головы их молекул гидрофильны и могут выступать из клеточной поверхности наружу.

Гликопротеиды клеточных оболочек находятся, по-видимому, во внешнем белковом слое плазматической мембраны. Их структура в деталях пока не известна. У одного из классов гликопротеидов остатки серина, входящие в состав пептидной цепи, связаны гликозидными связями с олигосахаридами, содержащими остатки N-ацетил-D-галактозамина и на конце цепи остатки N-ацетилнейраминовой кислоты.

Кислые мукополисахариды сильно гидратированы. Они представляют собой желеподобные, липкие или скользкие вещества, которые служат своеобразной межклеточной «смазкой» и одновременно лабильным цементирующим материалом. Повсеместно встречается такой кислый мукополисахарид, как гиалуроновая кислота; она входит в состав внеклеточного вещества большинства видов соединительной ткани позвоночных, содержится в клеточных оболочках или находится вблизи них и в больших количествах присутствует в синовиальной жидкости и стекловидном теле.

Гиалуроновая кислота — линейный полимер. Поскольку ее карбоксильные группы полностью ионизированы и, следовательно, при pH 7,0 несут отрицательный заряд, она растворима в воде, в которой образует очень вязкие растворы.

Другой мукополисахарид, обнаруженный в составе внеклеточного основного вещества, а также в составе клеточных оболочек, — хондроитин. По своей структуре он почти идентичен гиалуроновой кислоте; единственное различие состоит в том, что вместо остатков N-ацетил-D-глюкозамина хондроитин содержит остатки N-ацетил-D-галактозамина.

1.5. Искусственные мембраны

Искусственные мембраны часто используют для изучения различных процессов. Выделяют три типа — монослои липидов, пленки бислойных липидных мембран и липосомы, или фосфолипидные везикулы.

Липидные монослои, или мономолекулярные пленки, используют для изучения свойств границы раздела мембраны и водной фазы. Технику их получения разработал Дж. Лэнгмюр (J. Langmuir) в 1917 г. Если на поверхность воды нанести каплю растворенных в каком-либо летучем растворителе фосфолипидов или жирных кис-

лот, то после распределения их молекул и испарения растворителя образуется мономолекулярная пленка. Как установил Дж. Лэнгмюр, при полном насыщении поверхностного слоя адсорбированные молекулы липидов располагаются перпендикулярно к поверхности воды таким образом, что в нее погружается гидрофильная полярная группа, а неполярная углеводородная цепь направлена вертикально вверх. Получается ориентированный слой молекул.

Если стеклянную пластинку опустить в воду с мономолекулярной пленкой липидов на поверхности, то эту пленку можно перенести на пластинку. При повторных погружениях на пластинке возникают бимолекулярные и даже полимолекулярные пленки,

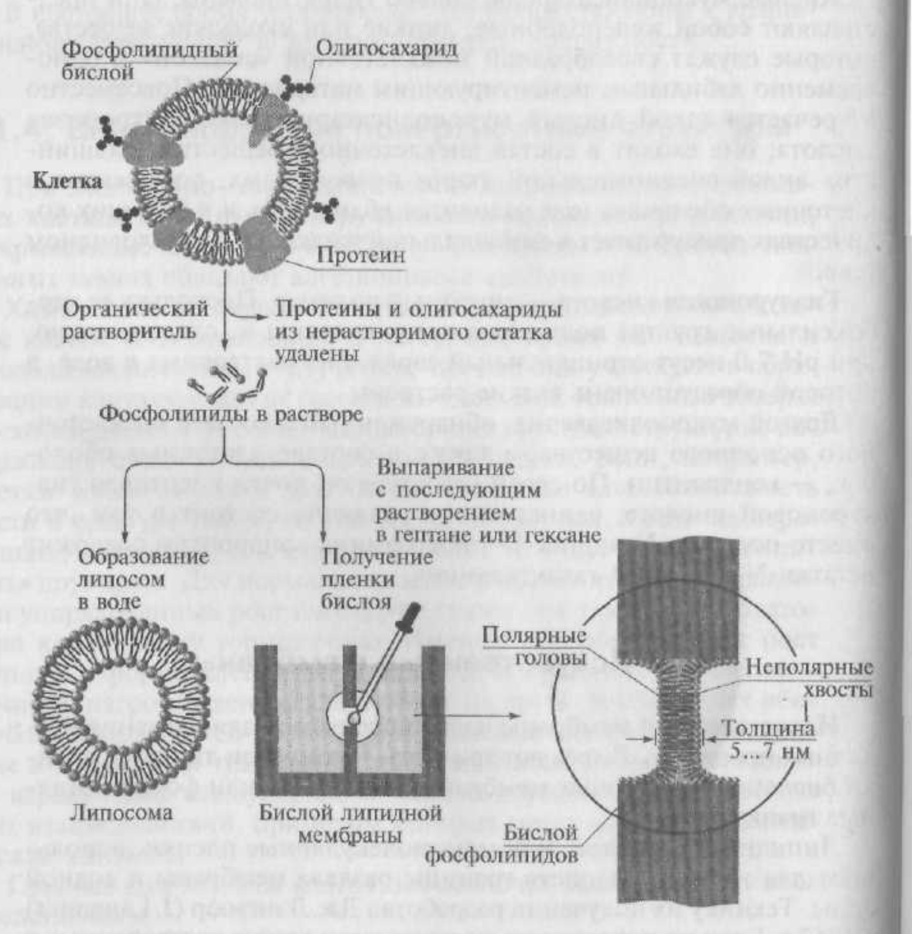


Рис. 1.21. Экспериментальное формирование чистого фосфолипидного бислоя, выделенного из клеточной мембраны, в виде липосомы и пленки

молекулы отдельных слоев которых соединяются друг с другом либо полярными, либо неполярными группами.

В 1962 г. П. Мюллер (P. Müller) предложил способ для получения бислойных мембран. На рис. 1.21 показан принцип выделения липидов из мембраны клетки с последующим формированием *бислоя липидной мембраны в виде пленки и самосборки липидов* в липосомы (фосфолипидные везикулы). С помощью этого бислоя уже можно было изучать проницаемость мембраны и генерацию потенциалов, а используя липосомы — исследовать внутреннюю структуру мембран.

Для получения бислойных мембран ткань гомогенизируют в органическом растворителе, например в смеси хлороформа с метанолом. Затем верхнюю фракцию, представляющую собой фосфолипиды, переносят в водный раствор и взбалтывают, в результате чего происходит самосборка мембран в виде липосом. Для получения бислоя липидной мембраны верхнюю фракцию предварительно выпаривают, а маслянистый остаток растворяют в гептане или гексане.

На рис. 1.21 показана камера с водным раствором, перегороженная тефлоновой пластинкой с небольшим отверстием. Именно на это отверстие наносят каплю растворенных липидов. По мере диффузии растворителей из капли в водную фазу молекулы липидов по поверхностям сферы (на границах капли) приближаются друг к другу и в конце концов соединяются в довольно стабильный двойной слой, закрывающий отверстие. Такая мембрана может длительное время существовать в водных растворах солей, а также служить границей раздела солевых растворов различного состава.

После этого многие исследователи изучали электропроводность подобных мембран, транспорт через них ионов, проницаемость для различных веществ, гидратацию, а также механические и оптические свойства. В результате выяснилось, что подобные пленки бислоя липидов являются хорошей моделью биологических мембран.

В 1968 г. П. Мюллеру и Д. Рудину (D. Rudin) при добавлении в систему белков удалось получить мембраны, обладающие электрогенными свойствами. Они предположили, что один белок образует в мембране катионпроводящие поры, а второй — анионпроводящие поры. Такие мембраны при действии электрического тока обладали способностью генерировать импульсы, подобные потенциалам действия.

Таким образом, метод создания искусственных мембран позволяет изучать многие свойства клеточных мембран. Основная его ценность состоит в том, что можно более детально изучать сложные биофизические процессы, поскольку исследования проводятся в сравнительно простых системах. Ценность этого метода

обусловлена также и тем, что на искусственных мембранах можно исследовать процессы самоорганизации биологических структур, которые пока еще очень слабо изучены и привлекают пристальное внимание ученых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Arrhenius S.A. Über die Dissociation der in Wasser Gelösten Stoffe // Z. Phys. Chem. (Leipzig). — 1887. — V. 1. — P. 631 — 648.

Arrhenius S.A. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion vor Rohrzucker durch Säuren // Z. Phys. Chem. (Leipzig). — 1889. — V. 4. — P. 226 — 248.

Arrhenius S.A. Lehrbuch der Electrochemie / S.A. Arrhenius. — Leipzig : Quandt & Handel, 1901.

Danielli J.F. A contribution to the theory of permeability of thin films / J. F. Danielli, H. Davson // J. Gen. Physiol. — 1935. — V. 5. — P. 495 — 508.

Du Bois Reymond E. Untersuchungen über die thierische Elektricität / E. Du Bois Reymond. — Berlin, 1848.

Fick A. Über Diffusion // Ann. Phys. Chem. — 1855. — V. 94. — P. 59 — 86.

Frye L. D. The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons / L. D. Frye, M. Edidin // J. Cell. Sci. — 1970. — V. 7(2). — P. 319 — 335.

Gorter E. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood / E. Gorter, F. Grendel // J. Expt. Med. — 1925. — V. 41. — P. 439 — 444.

Molecular cell biology / ed. by H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk et al. — 3rd ed. — N.Y. : Freeman and Company, 1995.

Müller P. Action potentials induced in biomolecular lipid membranes // P. Müller, D. O. Rudin // Nature. — 1968. — V. 217(5130). — P. 713 — 719.

Müller P. Resting and action potentials in experimental bimolecular lipid membranes / P. Müller, D.O. Rudin // J. Theor. Biol. — 1968. — V. 18(2). — P. 222 — 258.

Müller P. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system / P. Müller, D. O. Rudin, H. T. Tien, W. C. Wescott // Nature. — 1962. — V. 194. — P. 979 — 980.

Nägeli K. W. Pflanzenphysiologische Untersuchungen / K. W. Nägeli, K. Cramer. — Zurich : F. Schultess, 1855.

Nernst W. Zur Kinetik der in Lösung befindlichen Körper: Theorie der Diffusion // Z. Phys. Chem. — 1888. — V. 20. — P. 613 — 637.

Overton E. Über die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen- und Tierzelle // Vierteljahrsschr. Naturforsch. Ges. Zurich. — 1895. — V. 40. — P. 159 — 201.

Overton E. Beiträge zur allgemeinen Muskel- und Nervenphysiologie, II, Über die Unentbehrlichkeit von Natrium (oder Lithium-) Ionen für den Kontraktionsakt des Muskels // Pflügers. Arch. Ges. Physiol. — 1902. — V. 92. — P. 346 — 386.

Pfeffer W. Osmosuntersuchungen / W. Pfeffer. — Leipzig, 1877.

Robertson J. D. The ultrastructure of frog muscle spindles, motor endings and nerve fibres // J. Physiol. — 1957, — V. 137(1). — P. 6 — 8.

Robertson J.D. Structural alterations in nerve fibers produced by hypotonic and hypertonic solutions // J. Biophys. Biochem. Cytol. — 1958. — V. 4(4). — P. 349 — 364.

Robertson J.D. The molecular structure and contact relationships of cell membranes // Prog. Biophys. Mol. Biol. — 1960. — V. 10. — P. 343 — 418.

Robertson J.D. Ultrastructure of excitable membranes and the crayfish median-giant synapse // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1961. — V. 94. — P. 339 — 389.

Robertson J.D. The membrane of the living cell // Sci. Am. — 1962. — V. 206. — P. 65 — 72.

Singer S.J. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes // S.J. Singer, G.L. Nicolson // Science. — 1972. — V. 175(23). — P. 720 — 731.

Von Mohl H. Crundzuge der Anatomie und Physiologie der vegetabilischen Zelle // H. Von Mohl. — Braunschwei, 1851.

ПАССИВНЫЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕМБРАНЫ КЛЕТКИ

2.1. Общая характеристика пассивных электрических свойств мембраны

Пассивные электрические свойства клетки связаны с электрическими *свойствами ее мембраны*, *цитоплазмы* и *внешней среды*. Как отмечалось в предыдущей главе, мембрана клетки представляет собой липидный бислой с включенными в него белками, часть из которых является ионными каналами, связывающими внутреннюю и внешнюю среду клетки.

Любую мембрану, как билипидную, так и реальную клеточную, можно смоделировать в виде эквивалентной электрической схемы, элементы которой будут играть роль как бислоя липидов, так и тех или иных структур, входящих в состав мембраны, внут-

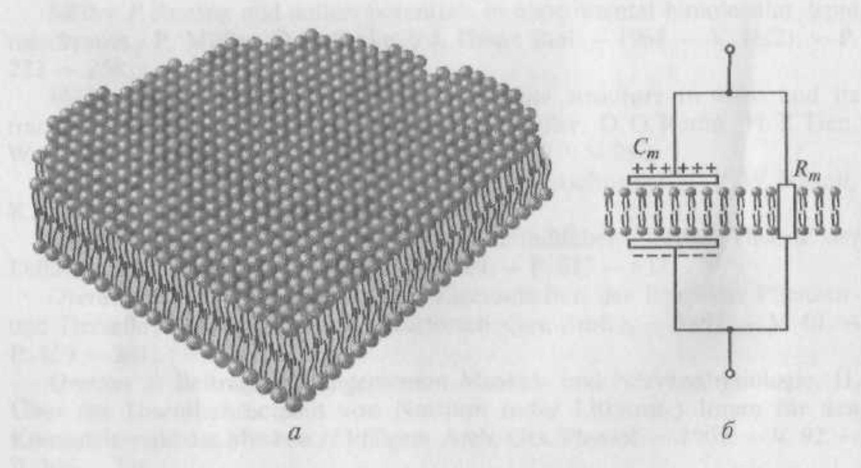


Рис. 2.1. Искусственная мембрана:

а — модель; *б* — эквивалентная электрическая схема, состоящая из емкости (конденсатора C_m), роль которого играет липидный бислой, и сопротивления (R_m) этого липидного бислоя

риклеточного и внеклеточного растворов. К таким электронным элементам относятся, прежде всего, конденсаторы и резисторы.

Начнем с искусственных мембран, представляющих собой только липидный бислой и не содержащих белков (рис. 2.1, *а*). Такую мембрану можно изобразить в виде эквивалентной электрической схемы, включающей резистивный компонент (R) и емкостный компонент мембраны (C). Это связано с тем, что липидный бислой впрямую можно уподобить и резистору, и конденсатору (рис. 2.1, *б*).

Удельная емкость (C) искусственных липидных мембран Мюллера и Мюллера—Рудина равна около 0,4—1,0 мкФ/см^2. Эта величина близка и для мембран клеток, поскольку и их емкость обусловлена исключительно липидным бислоем. Вместе с тем ис-

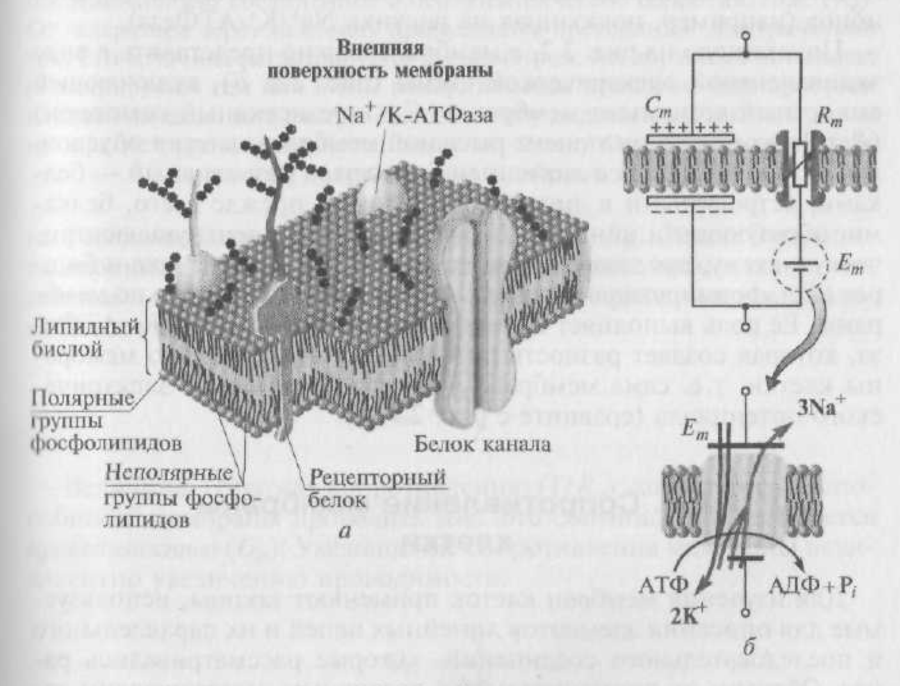


Рис. 2.2. Мембрана клетки:

а — модель; *б* — эквивалентная электрическая схема, состоящая из конденсатора (C_m), роль которого играет липидный бислой, переменного сопротивления (R_m), при помощи которого моделируют ионные каналы, находящиеся в открытом или закрытом состоянии, и, наконец, батареи (E_m), создающей разность потенциалов между внешней и внутренней средой клетки. Обратите внимание, что на эквивалентной электрической схеме мембраны элемент «Батарея» последовательно соединен с элементом «Сопротивление», что соответствует требованиям классической электроники. Однако роль батареи выполняет все та же мембрана, а ее разность потенциалов создает находящийся в мембране белок (фермент) Na^+/ K^+-АТФаза, которая выделена схематично в виде отдельного рисунка

кусственный липидный бислой обладает крайне высоким сопротивлением (R), величина которого лежит в диапазоне 10^6—10^9 Ом/см^2 (поскольку жир по существу является «изолятором»), что на несколько порядков выше сопротивления биологической мембраны (R_m), величина которой около 10^3 Ом/см^2. Как уже отмечалось, столь высокое сопротивление липидного бислоя можно понизить путем добавления белков или соединений, образующих ионные каналы.

Рассмотрим теперь реальную мембрану клетки, представленную на рис. 2.2. Она содержит, разумеется, липидный бислой, в который встроены белковые молекулы, выполняющие разнообразные функции, о чем речь пойдет далее. Это и различные рецепторные белки, и белки ионных каналов, через которые ионы движутся пассивно, и, наконец, белки, ответственные за активный перенос ионов (например, показанная на рисунке Na^+/K^+-АТФаза).

Показанную на рис. 2.2, *а* мембрану можно представить в виде эквивалентной электрической схемы (рис. 2.2, *б*), включающей емкостный компонент мембраны (C_m) и резистивный компонент (R_m). Емкостный компонент реальной мембраны клетки обусловлен исключительно ее липидным бислоем, а резистивный — белками, встроенными в липидный бислой и, прежде всего, белками, образующими ионные каналы. Но в эквивалентную электрическую схему, представленную на рис. 2.2, *б*, введена еще и батарея (E_m), формирующая разность потенциалов относительно мембраны. Ее роль выполняет специфический белок — Na^+/K^+-АТФаза, которая создает разность потенциалов относительно мембраны клетки, т.е. сама мембрана является источником электрического потенциала (сравните с рис. 2.1, *б*).

2.2. Сопротивление мембраны клетки

Для изучения мембран клеток применяют законы, используемые для описания элементов линейных цепей и их параллельного и последовательного соединений, которые рассматривались ранее. Обсудим их применительно к пассивным электрическим характеристикам клеток.

Одно из этих пассивных электрических свойств — отношение изменения мембранного потенциала (ΔV_m) к току I, текущему через мембрану (рис. 2.3). Это отношение называется *сопротивлением мембраны* (R) и измеряется в омах. Сопротивление характеризует способность мембраны препятствовать протеканию тока. Поскольку ток течет не только через нее, но и через внутреннюю и наружную среды, а геометрия клетки часто неизвестна, суммарное сопротивление, преодолеваемое током, называется *вход-*

Рис. 2.3. Эквивалентная электрическая схема для участка мембраны, включающая только батарею (E_m), формирующую мембранный потенциал, и последовательно соединенное с ней электрическое сопротивление (R_m). От генератора через мембрану пропускается постоянный электрический ток. Его величина регистрируется амперметром. Мембранный потенциал регистрируется тем или иным измерительным прибором (для простоты на схеме показан вольтметр). Зная величину подаваемого тока и величину зарегистрированного потенциала, по закону Ома можно рассчитать входное сопротивление мембраны клетки

ным сопротивлением (R_{input} или, сокращенно, R_{in}). Закон Ома, описывающий соотношение между током, напряжением и сопротивлением в электрических цепях, полностью применим и к биологическим мембранам:

$$R_{in} = \frac{\Delta V_m}{I}.$$

Величина, обратная сопротивлению ($1/R_{in}$), характеризует способность мембраны проводить ток. Это соотношение называется *проводимостью* (G_{in}). Уменьшение сопротивления мембраны эквивалентно увеличению проводимости.

$$G_{in} = \frac{I}{\Delta V_m}.$$

Рассмотрим идеализированное тело нейрона без аксонов и дендритов (рис. 2.4).

Если с помощью внутриклеточного электрода пропускать ток силой 0,1 нА (1 нА = 10^{-9} А) наружу, то он будет равномерно протекать через всю поверхность клеточной мембраны (за счет эквипотенциальности поверхности шара идеализированной клетки). В результате деполяризационный сдвиг потенциала на 10 мВ, зарегистрированный в соседней точке внутри клетки, указывает

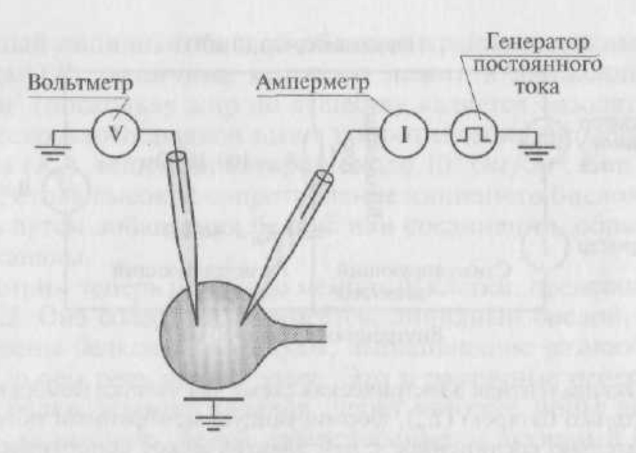


Рис. 2.4. Идеализированное тело клетки с эквипотенциальной поверхностью (например, нейрона без аксона и дендритов) при исследовании внутриклеточных потенциалов. Согласно классической схеме в клетку введены один микроэлектрод, регистрирующий ее потенциал, и второй микроэлектрод, соединенный с генератором прямоугольных импульсов электрического тока, используемый для смещения потенциала клетки в сторону деполяризации или гиперполяризации

на то, что в этой точке клетка (мембрана и аксоплазма) имеет сопротивление 100 МОм (1 МОм = 10^6 Ом):

$$R_{in} = \frac{\Delta V_m}{I} = \frac{10 \cdot 10^{-3}}{1 \cdot 10^{-10}} = 100 \cdot 10^6 \text{ Ом}.$$

Такая величина типична, например для нервных клеток моллюсков. В зависимости от геометрии клетки и свойств мембраны входные сопротивления нейронов могут варьировать в пределах от 10^5 до 10^8 Ом; чем меньше клетка, тем выше ее входное сопротивление (при одинаковых свойствах мембраны). Сопротивление мембраны можно изобразить соединенным последовательно с батареей, создающей мембранный потенциал E_m (см. рис. 2.3).

Поскольку при измерении R_{in} размеры и форма нейрона не учитываются, этот параметр не подходит для сравнения свойств мембраны у клеток различной величины и формы. Вместо этого используют стандартизованный параметр — удельное сопротивление мембраны (R_m), которое соответствует поперечному сопротивлению 1 см^2 мембраны.

Таким образом, удельное сопротивление мембраны клетки определяется двумя факторами:

1) входным сопротивлением мембраны, являющимся мерой проводящих свойств мембраны (ее проницаемости для ионов);

2) общей площадью поверхности мембраны.

Удельное сопротивление цитоплазмы (r_{in}) определяют как сопротивление 1 см цитоплазмы с площадью поперечного сечения 1 см^2, однако r_{in} мало́ (50 Ом/см) и им можно пренебречь.

Кроме того, используется удельное внеклеточное сопротивление r_{out} (Ом/см) на единицу длины для тока, текущего, например, вдоль аксона.

Для сферической клетки без дендритов с радиусом r и поверхностью $4\pi r^2$ величину R_m определяют по формуле

$$R_m = R_{in} 4\pi r^2.$$

Для клетки, имеющей входное сопротивление 100 МОм и радиус 100 мкм (площадь поверхности $1{,}26 \cdot 10^{-3}$ или приблизительно 10^{-3} см^2), получим

$$R_m = 10^8 \text{ Ом} \cdot 10^{-3} \text{ см}^2 = 10^5 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2 = 100\,000 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2.$$

Эта величина также типична для тел нервных клеток моллюсков. У большинства других животных мембраны клеточных тел нейронов более проницаемы для ионов и обладают значительно меньшими величинами мембранного сопротивления — примерно от 20 Ом · см^2 (перехваты Ранвье периферических аксонов лягушки) до 16 000 Ом · см^2 (тела маутнеровских клеток миноги). Однако в экспериментальной работе площадь поверхности клетки измерить крайне сложно, поэтому в исследованиях для нормирования используют емкость мембраны, так как она пропорциональна площади поверхности клетки.

2.3. Вольт-амперная характеристика

Вольт-амперная характеристика, или $I—V$-кривая, представляет собой зависимость тока, генерируемого клеткой, от подаваемого на нее потенциала при его ступенчатом смещении в положительную или отрицательную область (например, от +100 до −100 мВ). Однако для определения пассивных электрических свойств мембраны применяют иной вариант ее построения. В этом случае клетку нельзя возбуждать, поэтому выбирают диапазон смещений потенциала в ответ на ступеньки электрического тока в подпороговой области, например от −80 до −40 мВ. При этом, зная величины подаваемых ступенек тока, протекающего через мембрану, можно регистрировать смещение ее потенциала.

Для того чтобы разобраться в этом вопросе, перед тем как рассматривать вольт-амперные характеристики мембраны, обратим внимание на вольт-амперные характеристики элементов, ее моделирующих, которые представлены на рис. 2.5. К ним относятся постоянное или переменное сопротивление и батарея.

На рис. 2.5 показаны вольт-амперные характеристики радиоэлектронных элементов, при помощи которых представляют эквивалентную электрическую схему мембраны клетки:

а — мембрана, моделируемая как одно, два или три параллельно включенных сопротивления, т.е. имеющая один, два или три открытых ионных канала, с наклонами характеристик соответственно *1—3*;

б — мембрана, моделируемая как сопротивление, и батарея, подключенная противоположными полюсами; в этом случае мембрана рассматривается как структура, имеющая канал с негативной или позитивной электродвижущей силой и негативным *1* или позитивным *2* смещением *I—V*-кривой относительно нуля;

в — мембрана, моделируемая как переменное сопротивление и батарея, подключенная противоположными полюсами; этот случай соответствует ситуации, когда каналы переходят из состояния с низкой проводимостью в состояние с высокой проводимостью (см. проводимость *g* относительно *V*). В этом случае вольт-амперные характеристики состоят из двух линейных сегментов;

г — мембрана, моделируемая как переменное сопротивление и батарея, подключенная противоположными полюсами. Это модель каналов со сглаженной потенциалзависимой вероятностью открытого состояния (см. средние *g* относительно *V*). В этом случае пунктирные линии соответствуют постоянно высокой проводимости и одинаковы с кривыми *1* и *2*, приведенными на рис. 2.5, *в*. Однако когда каналы закрыты при негативных потенциалах, понижающих *g*, ток уменьшается соответственно от его максимального значения.

После изучения этого вопроса рассмотрим реальную клетку. Пропуская через мембрану ступенчатые импульсы деполяризующего или гиперполяризующего тока в диапазоне от –80 до –40 мВ, можно построить вольт-амперную характеристику клетки (в данном случае зависимость установившегося потенциала от силы пропускаемого тока) и выяснить, является ли входное сопротивление полностью пассивным (линейным) или зависит от мембранного потенциала (рис. 2.6). Пропуская через клетку ступенчатые импульсы электрического тока положительной или отрицательной полярности, можно построить *I—V*-кривую. Во всех трех приведенных случаях применяют одинаковые импульсы электрического тока, представленные в верхнем ряду:

а — ступенчатое увеличение прямоугольных импульсов электрического тока положительной или отрицательной полярности вызывает пропорциональное и симметричное увеличение потенциала клетки (средний рисунок), что характеризуется линейной *I—V*-кривой; зависимость потенциала клетки от пропускаемого через нее тока представляет собой прямую линию (нижний рисунок);

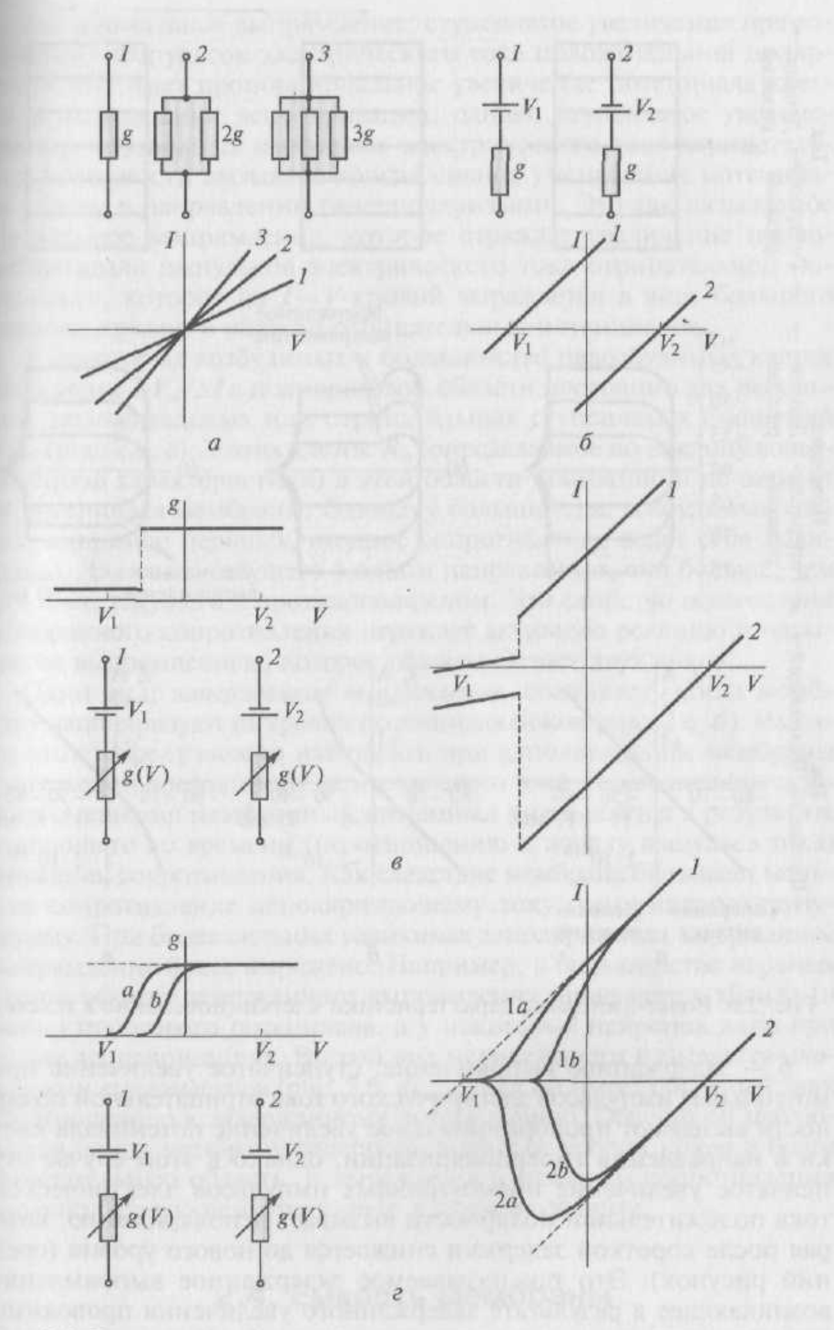


Рис. 2.5. Вольт-амперные характеристики радиоэлектронных элементов, при помощи которых представляют эквивалентную электрическую схему мембраны клетки (пояснение в тексте)

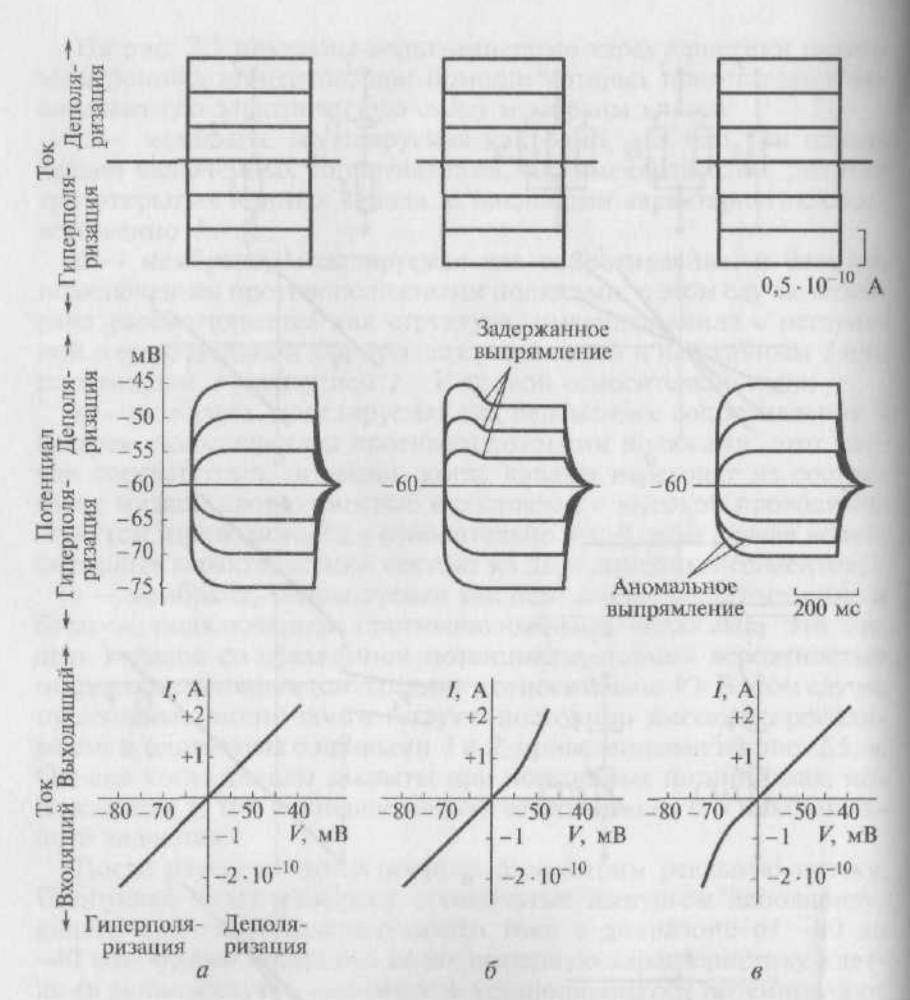


Рис. 2.6. Вольт-амперные характеристики клетки (пояснение в тексте)

б — задержанное выпрямление; ступенчатое увеличение прямоугольных импульсов электрического тока отрицательной полярности вызывают пропорциональное увеличение потенциала клетки в направлении гиперполяризации; однако в этом случае ступенчатое увеличение прямоугольных импульсов электрического тока положительной полярности вызывает деполяризацию, которая после короткой задержки снижается до нового уровня (средний рисунок). Это так называемое задержанное выпрямление, возникающее в результате задержанного увеличения проводимости для деполяризующего тока, которое на *I*—*V*-кривой выражается в наличии характерного изгиба вверх в области положительных значений мембранного потенциала (нижний рисунок);

*в — аномальное выпрямление; ступенчатое увеличение прямоугольных импульсов электрического тока положительной полярности вызывает пропорциональное увеличение потенциала клетки в направлении деполяризации; однако ступенчатое увеличение прямоугольных импульсов электрического тока отрицательной полярности вызывает прогрессивное уменьшение потенциала клетки в направлении гиперполяризации. Это так называемое аномальное выпрямление, которое отражает увеличение проводимости для импульсов электрического тока отрицательной полярности, которое на $I-V$-кривой выражается в виде большего наклона кривой в области отрицательных потенциалов.

У некоторых возбудимых и большинства невозбудимых клеток отношение $\Delta V_m/\Delta I$ в подпороговой области постоянно для небольших положительных или отрицательных ступенчатых смещений тока (рис. 2.6, *а*). У этих клеток R_{in} (определяемое по наклону вольтамперной характеристики) в этой области постоянно и не зависит от потенциала мембраны. Однако у большинства возбудимых клеток, например нервных, входное сопротивление ведет себя нелинейно. Для тока, текущего в одном направлении, оно больше, чем для тока, текущего в противоположном. Это свойство асимметрии мембранного сопротивления отражает активную реакцию и называется выпрямлением, которое обычно бывает двух видов.

Один вид, ***задержанное выпрямление***, возникает, когда мембрану деполяризуют от уровня потенциала покоя (рис. 2.6, *б*). Именно этот эффект можно наблюдать при деполяризации мембраны импульсами постоянного электрического тока. После первоначального смещения мембранный потенциал уменьшается в результате отстающего во времени (по отношению к началу импульса тока) снижения сопротивления. Как следствие мембрана оказывает меньшее сопротивление деполяризующему току, чем гиперполяризующему. При более сильных величинах деполяризации задержанное выпрямление более выражено. Например, в большинстве нервных клеток эффект задержанного выпрямления проявляется вблизи (и выше) порогового потенциала, а у некоторых нейронов даже при малых деполяризациях. Второй вид нелинейности называется ***аномальным выпрямлением*** (рис. 2.6, *в*), так как он имеет обратный знак по отношению к задержанному выпрямлению. Обычно он наблюдается, когда мембрану гиперполяризуют от уровня покоя в более отрицательную область, и выражается в меньшем сопротивлении гиперполяризующему току, чем деполяризующему.

2.4. Емкость мембраны

Стимулируя клетку небольшими импульсами электрического тока, можно изучить еще одно свойство мембраны. Если даже

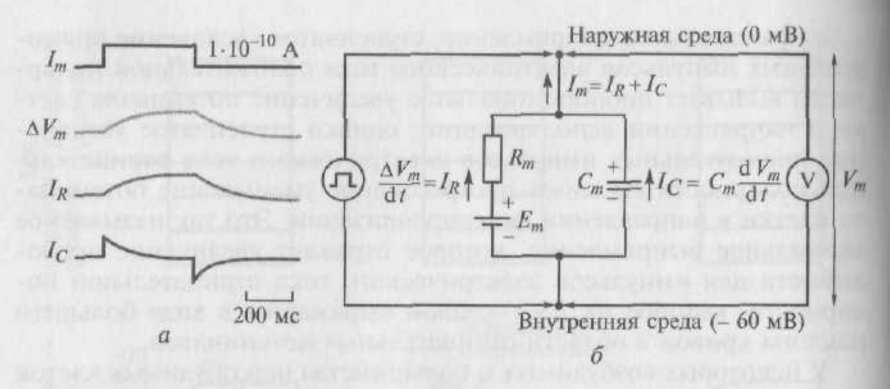


Рис. 2.7. Эквивалентная электрическая схема для участка мембраны:

а — если приложен прямоугольный импульс электрического тока I_m, создающий небольшой (пассивный электротонический) потенциал ΔV_m, то этот ток разлагается на резистивную и емкостную составляющие. Разностью I_m и I_R является I_C; *б* — цепь содержит батарею E_m, создающую потенциал покоя, соединенную последовательно с сопротивлением R_m и параллельно с емкостью C_m. Эквивалентная электрическая схема моделирует небольшой участок мембраны. На схеме показано, как часть тока проходит через сопротивление I_R и называется ионным током; другая часть течет к емкости и от емкости и называется емкостным током I_C

импульсы тока (I_m), вызывающие изменение мембранного потенциала (ΔV_m), нарастают и спадают очень быстро (это прямоугольные импульсы), мембранный потенциал все равно будет нарастать и спадать медленно (см. рис. 2.6, *а*, рис. 2.7, *а*). Это обусловлено еще одним физическим свойством мембраны — ее емкостью.

Емкость накапливает заряды на своей поверхности и поэтому будет оказывать сопротивление любым изменениям потенциала. Ток может течь в емкость или из нее только тогда, когда напряжение на ней меняется.

Как только емкость зарядится до потенциала, равного подаваемому на нее, емкостный ток прекратится. Таким образом, емкость не препятствует изменениям потенциала, а замедляет его увеличение и уменьшение.

Мембрана работает как емкость потому, что внутриклеточная и внеклеточная среды представляют собой электролиты, которые являются хорошими проводниками, тогда как имеющая высокое сопротивление мембрана служит хорошим изолятором. Благодаря своим емкостным свойствам клетки могут накапливать (или разделять) заряды.

Например, если импульс постоянного электрического тока вызовет изменение мембранного потенциала, то на внутренней и наружной поверхностях мембраны возникнет заряд, пропорциональный ΔV_m. Входная емкость мембраны (C_{in}) будет определяться

как отношение заряда q (Кл), возникшего на каждой стороне мембраны, к изменению мембранного потенциала:

$$C_{in} = \frac{q}{\Delta V_m}.$$

Емкость клетки прямо пропорциональна площади поверхности мембраны (большая площадь внешнего и внутреннего жидких проводников позволяет мембране удержать больший заряд) и обратно пропорциональна ее толщине (увеличение толщины мембраны уменьшает взаимодействие зарядов, находящихся на каждой из проводящих поверхностей). Поскольку толщина всех клеточных мембран примерно одинакова (7,5 нм), емкость мембраны (C_m) *зависит главным образом от площади поверхности и рассчитывается* на 1 см^2 поверхности мембраны. Мембранный потенциал клетки равен заряду мембраны, деленному на ее емкость ($V_m = q/C_m$). Емкость измеряют в фарадах; 1 Ф = 1 Кл/1 В (1 Кл = $6{,}24 \cdot 10^{18}$ электронов).

Если пропустить прямоугольный импульс электрического тока только через сопротивление мембраны, он вызвал бы прямоугольный скачок напряжения. Но поскольку мембрана работает *так же, как и емкость, а та удерживает заряды, проходящему через* мембрану току требуется некоторое время, чтобы изменить потенциал на мембране.

Поскольку емкость и сопротивление мембраны соединены параллельно, напряжение на них будет одно и то же, так что в каждый данный момент емкость мембраны будет нести заряд, пропорциональный мембранному потенциалу. Для того чтобы импульс *электрического тока смог полностью изменить мембранный потенциал* до нового значения (определяемого силой тока и сопротивлением мембраны), ток сначала должен изменить заряд на емкости мембраны и сдвинуть его до уровня, соответствующего новому мембранному потенциалу. Таким образом, ток, подаваемый в клетку, сначала должен войти в емкость и выйти из нее, изменив ее заряд.

По мере того как мембранный потенциал постепенно приближается к своему новому значению, все меньшая доля тока проходит через емкость и все большая доля начинает проходить через сопротивление. Когда емкость зарядится до конца, весь ток будет течь через сопротивление.

Таким образом, когда на мембрану подается импульс электрического тока, он идет по двум путям. Сначала ток протекает по емкости мембраны, изменяя заряд на ней. Этот компонент тока называется *емкостным током* (I_C).

По мере заряда емкости снижаются емкостная составляющая тока и основная часть оставшегося тока, та, которая шла через сопротивление. Этот второй компонент называется *током сопро-*

тивления (I_R), или *ионным током* (в клетках электричество переносится только ионами). Эти токи схематически представлены на рис. 2.7, *а*.

Итак, если мы подаем на мембрану ток, то протекание его через R_m описывается законом Ома:

$$I_R = \frac{\Delta V_m}{R_m},$$

где ΔV_m — изменение мембранного потенциала, производимое током I_R.

Протекание тока через емкость можно рассчитать следующим образом. Емкостный ток равен скорости изменения заряда, т.е. $I_C = \mathrm{d}q/\mathrm{d}t$. Поскольку $q = C_m V_m$, величина емкостного тока определяется величиной емкости C_m и скоростью изменения напряжения ($\mathrm{d}V_m/\mathrm{d}t$):

$$I_C = C_m \frac{\mathrm{d}V_m}{\mathrm{d}t}.$$

Таким образом, общий ток, проходящий через мембрану, будет равен:

$$I_m = \frac{\Delta V_m}{R_m} + C_m \frac{\mathrm{d}V_m}{\mathrm{d}t}.$$

Временной ход I_R можно оценить по записи мембранного потенциала, так как $\Delta V_m = IR_m$. Поскольку $I_R + I_C = I_m$, ток через емкость (I_C) можно получить, вычитая из I_m величину I_R (см. рис. 9.7, *а*).

2.5. Постоянные времени и длины

На рис. 2.7, *б* приведена эквивалентная электрическая схема, моделирующая небольшой участок мембраны. Если такие схемы соединить сопротивлениями, моделирующими цитоплазму и внеклеточную жидкость, то из них можно составить эквивалентную электрическую схему клетки (или аксона) (рис. 2.8). Пассивные свойства как эквивалентной электрической схемы, так и мембраны можно полностью описать двумя параметрами: постоянной времени и постоянной длины. Эти параметры важны для понимания вклада пассивных свойств мембран клеток в интегративные процессы. Постоянная времени характеризует временной ход изменений мембранного потенциала, т.е. скорость, с которой он меняется при переходе от одного значения к другому. Постоянная длины характеризует скорость, с которой данное изменение на-

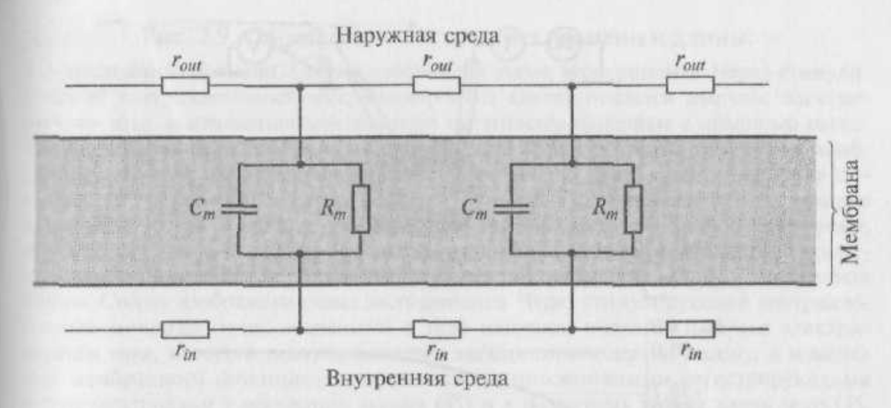


Рис. 2.8. Эквивалентная электрическая схема мембраны клетки. На схеме R_m и C_m представлены как дискретные элементы. В действительности R_m и C_m распределены равномерно по всей поверхности клетки. Аналогичным образом внутриклеточное и внеклеточное сопротивления среды (r_{in}, r_{out}) для тока, идущего вдоль аксона, также представлены как дискретные элементы, хотя они распределены по внутриклеточной и внеклеточной среде

пряжения убывает с расстоянием. Рассмотрим эти параметры подробнее.

Постоянная времени мембраны (τ_m) — это время, необходимое для того, чтобы импульс постоянного тока зарядил емкость мембраны (сферической клетки) на 63 % или, точнее, довел ее заряд до 1 – 1/e от его конечного значения, обусловленного величиной импульса электрического тока.

В фазе подъема изменение потенциала V_m во времени при подаче импульса электрического тока описывается уравнением

$$V_m = IR_m(1 - e^{-t/R_mC_m}),$$

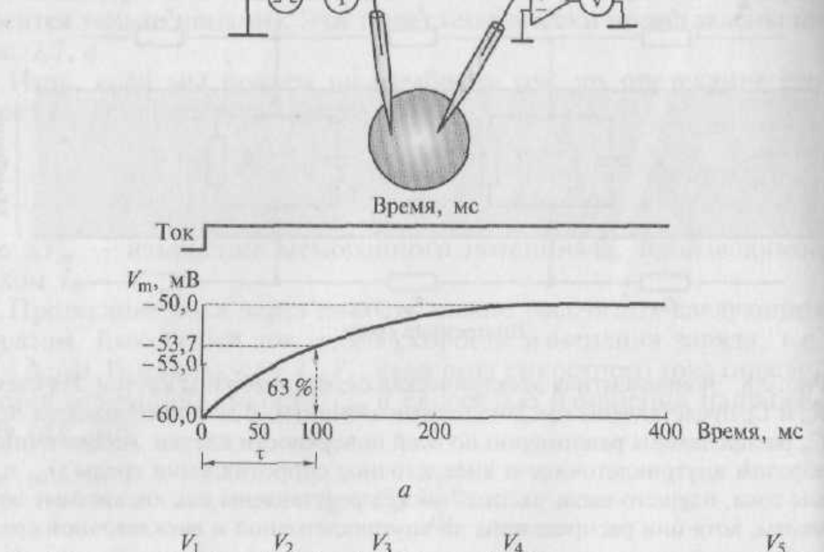
где I — величина ступеньки тока, пропускаемого через мембрану; IR_m — конечное значение мембранного потенциала, обусловленного импульсом электрического тока.

При $t = \tau = R_mC_m$ имеем:

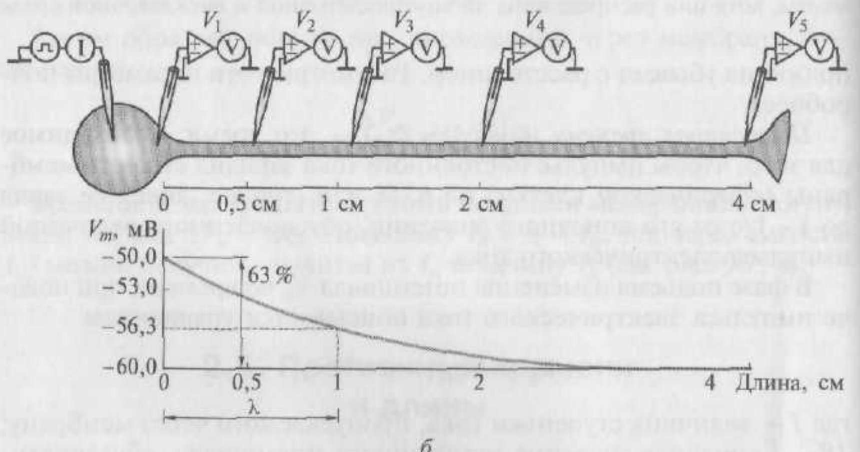
$$V_m = IR_m(1 - e^{-1}) = IR_m(1 - 1/e) = 0{,}63IR_m.$$

Постоянную времени мембраны ($\tau = R_mC_m$) можно измерить непосредственно по записям напряжения (рис. 2.9, *а*). В приведенном примере для нейрона моллюска с R_m = 100 000 Ом · см^2 типичное значение τ_m будет равно 100 мс. Для различных клеток значения τ_m варьируются от одной до нескольких сотен миллисекунд. У сферической клетки без аксона и дендритов постоянную времени можно представить как

$$\tau_m = R_mC_m.$$



а



б

Таким образом, измерение τ_m важно также для оценки C_m. Пусть τ_m равно 100 мс, а R_m — 100 000 Ом · см², тогда емкость C_m будет равна 1 мФ/см²:

$$C_m = \frac{100 \cdot 10^{-3}\ \text{с}}{1 \cdot 10^{5}\ \text{Ом} \cdot \text{см}^2} = 100 \cdot 10^{-8}\ \text{Ф/см}^2 = 1\ \text{мФ/см}^2 .$$

Постоянная длины мембраны (λ) — это расстояние от точки в нейроне, где при помощи внутриклеточного электрода был изменен мембранный потенциал, до той точки на аксоне, где этот потенциал потеряет 63 % или, иначе, 1 = 1/е своей первоначальной величины.

Рис. 2.9. Определение постоянных времени и длины:

а — постоянная времени. Сверху изображена схема эксперимента. Через стимулирующий внутриклеточный микроэлектрод на клетку подается импульс электрического тока, а изменения мембранного потенциала измеряют с помощью регистрирующего внутриклеточного микроэлектрода. Внизу показано изменение мембранного потенциала во времени (нижняя кривая) на фоне подачи импульса постоянного электрического тока (верхняя кривая). Ток вызывает деполяризацию величиной 10 мВ и сдвигает мембранный потенциал с –60 до –50 мВ. Время, необходимое для достижения 63 % этого изменения, называют постоянной времени клеточной мембраны. В данном примере она равна 100 мс; *б* — постоянная длины. Сверху изображена схема эксперимента. Через стимулирующий внутриклеточный микроэлектрод, введенный в тело нейрона, подается импульс электрического тока, который распространяется электротонически по аксону, а изменения мембранного потенциала измеряются внутриклеточными регистрирующими микроэлектродами у основания аксона (V_1) и в различных точках вдоль него (V_2, V_3, V_4, V_5). Внизу показано изменения мембранного потенциала в зависимости от расстояния. В теле клетки ток вызывает деполяризацию величиной 10 мВ и сдвигает мембранный потенциал с –60 до –50 мВ (V_1). На расстоянии 1 см (V_2) это изменение потенциала уменьшается на 63 %, достигая 37 % своего исходного значения (3,7 мВ). Это расстояние (1 см) называют постоянной длины мембраны аксона

Изменения потенциала в различных точках аксона можно измерить при помощи введения регистрирующих электродов (V_1, V_2, V_3, V_4) на различных расстояниях вдоль аксона (рис. 2.9, *б*). Пусть аксон имеет большой диаметр, сравнимый с размером клеточного тела. Тогда постоянная длины (в сантиметрах) будет определяться формулой:

$$\lambda = \frac{1}{2}\sqrt{\frac{dR_m}{r_{in}}},$$

где R_m — удельное сопротивление мембраны; r_{in} — удельное сопротивление аксоплазмы; d — диаметр аксона.

Приведена лишь конечная формула, поскольку в основе ее вывода лежат те же принципы, что и для постоянной времени.

Постоянная длины мембраны — это расстояние, на которое вдоль аксона электротонически распространяются подпороговые сигналы. Если нейрон имеет сопротивление $R_m = 100\,000$ Ом · см^2 и $r_{in} = 50$ Ом · см^2, постоянная длины при диаметре аксона 20 мкм равна 1 см. Но для аксонов малого диаметра d постоянная длины может быть значительно меньше и достигать 0,1 см.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Камкин А. Г. Техническое обеспечение микроэлектродного исследования клеток / А. Г. Камкин, И. С. Киселева. — М., 1989.

Фундаментальная и клиническая физиология / под ред. А. Г. Камкина, А. А. Каменского. — М. : Изд. центр «Академия», 2004.

Brinley F.J., Jr. Excitation and conduction in nerve fibers // Medical Physiology / ed. by V.B. Mountcastle. — 13th ed. — St. Louis : C.V. Mosby, 1974. — P. 34 — 76.

Hille B. Ionic channels of excitable membranes / B. Hille. — Sunderland. Mass : Sinauer Associates, 1992.

Kandel E. R. Cellular basis of behavior / E. R. Kandel. — N.Y. : Freeman and Company, 1976.

ГЛАВА 3

ПУТИ ПЕРЕМЕЩЕНИЯ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ

3.1. Общая характеристика путей перемещения

При всем многообразии строения и физико-химических свойств молекул проникающих веществ можно выделить два механизма перемещения веществ через мембрану:

1) посредством простой диффузии, т.е. без помощи специфического переносчика;

2) при помощи специфических переносчиков.

В первом случае выделяют диффузию соединений непосредственно через липидный бислой мембраны и ионов через ионные каналы. Во втором случае выделяют так называемую облегченную диффузию, первично-активный транспорт и вторично-активный транспорт (рис. 3.1).

Рассмотрим сначала простую диффузию. Посредством простой диффузии без помощи специального переносчика, во-первых, осуществляется транспорт соединений непосредственно через липидный бислой. В этом случае вещества проникают в клетку путем их растворения в липидах клеточной мембраны, поэтому данный способ присущ водонерастворимым органическим соединениям и газам (например, кислороду и углекислому газу). Во-вторых, вещества перемещаются через ионные каналы клеточной мембраны, соединяющие цитоплазму клеток с внешней средой. Клетки используют этот путь для транспорта преимущественно ионов Na^+, Ca^{2+}, K^+. Это пассивный ионный транспорт, который определяется градиентами концентрации и электрического поля (электрохимическим градиентом).

Применяемое в данном случае понятие «градиент» отличается от его определения в математике или физике. В физико-химических или биологических системах используют термин «по градиенту», когда речь идет о движении от большего к меньшему электрохимическому потенциалу. При движении от меньшего к большему электрохимическому потенциалу используют термин «против градиента».

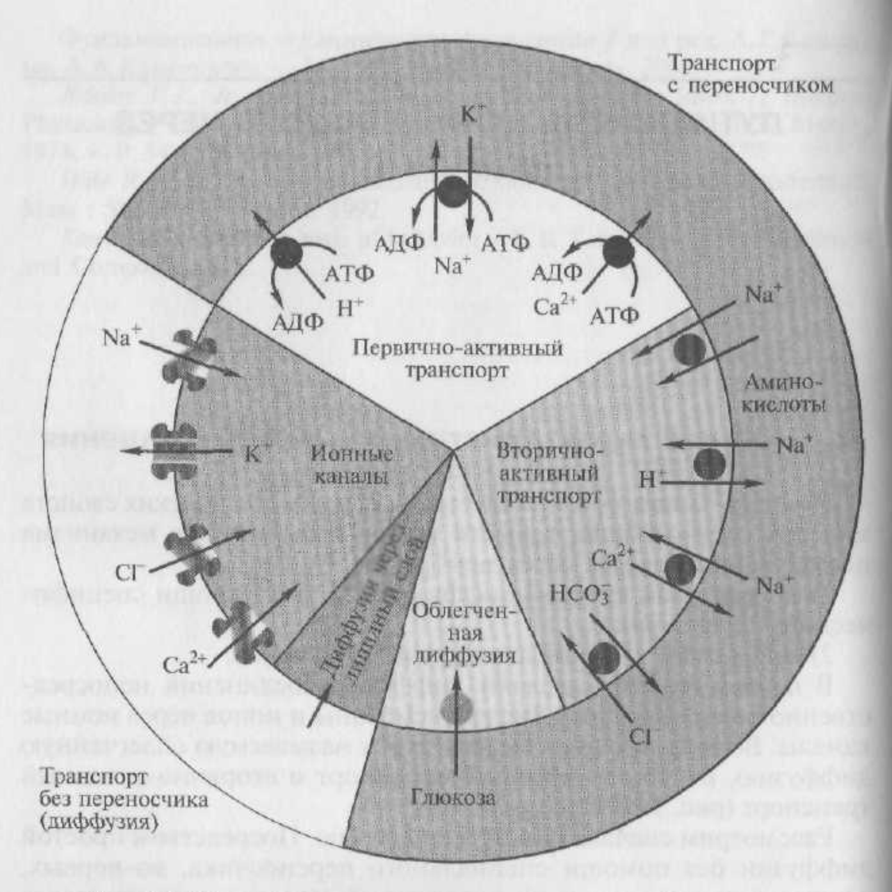


Рис. 3.1. Пути проникновения веществ через мембрану клетки

Изменение электрохимического потенциала $\Delta\mu$ (без учета химической энергии, или химических потенциалов) можно записать в виде

$$\Delta\mu = \mu_0 + RT\ln(C_2/C_1) + zF(\varphi_2 - \varphi_1).$$

Это максимальная работа, которую можно совершить при переносе одного моля ионов. В таком случае $RT\ln(C_2/C_1)$ равно работе по концентрированию раствора от C_1 до C_2, а $zF(\varphi_2 - \varphi_1)$ равно работе по преодолению сил электрического отталкивания, возникающих при разности потенциалов $(\varphi_2 - \varphi_1)$ между растворами.

При помощи специфических переносчиков осуществляется энергетически независимая облегченная диффузия ряда соединений.

Энергетически зависимый первично-активный транспорт ионов Na^+, Ca^{2+}, K^+ и H^+ — это перенос веществ против их электрохими-

ческих градиентов с затратой энергии АТФ. В результате активного переноса ионов клетки способны накапливать их в более высоких по сравнению с окружающей средой концентрациях и вопреки их заряду. Многие градиенты, возникающие на клеточной мембране и являющиеся необходимым условием для пассивного переноса *ионов по ионным каналам, появляются именно в результате* их активного транспорта. Так, градиенты концентрации K^+ и Na^+ возникают в результате активного переноса этих ионов, т.е. работы специального Na^+/K^+-насоса. За счет создающейся по обе стороны мембраны разности концентраций осуществляется диффузия этих ионов по градиентам и генерация потенциалов мембраны.

Наконец, вторично-активный транспорт ряда ионов и молекул также использует энергию, накопленную за счет потребления АТФ и затраченную на создание градиента концентрации (поэтому данный вид транспорта так называется).

3.2. Пути перемещения веществ без помощи специфического переносчика

3.2.1. Основные представления о диффузии

Перемещение веществ без помощи специфического переносчика — их пассивный транспорт — подразумевает диффузию, т.е. процесс самопроизвольного выравнивания концентраций частиц или макромолекул в среде. Если концентрация в различных частях системы неодинакова, то возникает поток вещества из области высокой концентрации в область низкой. Поток вещества прямо пропорционален градиенту концентрации этого вещества в данной системе.

Градиент концентрации — это разность концентрации вещества, приходящаяся на единицу длины. Под скоростью диффузии понимают количество вещества, диффундирующего в единицу времени через единицу площади. Диффузия веществ, растворимых в липидах, может осуществляться непосредственно через липидный бислой. Ионы диффундируют только через ионные каналы.

Основным механизмом пассивного транспорта незаряженных веществ или ионов, обусловленным наличием концентрационного градиента в отсутствие электрического поля, является диффузия.

Диффузией называется процесс самопроизвольного выравнивания концентраций частиц или макромолекул в среде. Иначе говоря, вещество в результате теплового хаотического движения

молекул самопроизвольно переходит из области большей его концентрации в область меньшей. Процесс диффузии прекратится, *когда концентрация вещества во всех частях раствора станет одинаковой*. На рис. 3.2 это показано более наглядно. В момент времени t_1 в отсеке *1* сосредоточено 18 молекул растворенного в воде вещества, а в отсеке *2* этих молекул нет, т. е. молекулы будут переходить только в отсек *2*, что показано одной длинной стрелкой. В момент времени t_2 в отсеке *1* осталось 13 молекул растворенного в воде вещества, а в отсек *2* перешло пять молекул, т. е. наблюда-

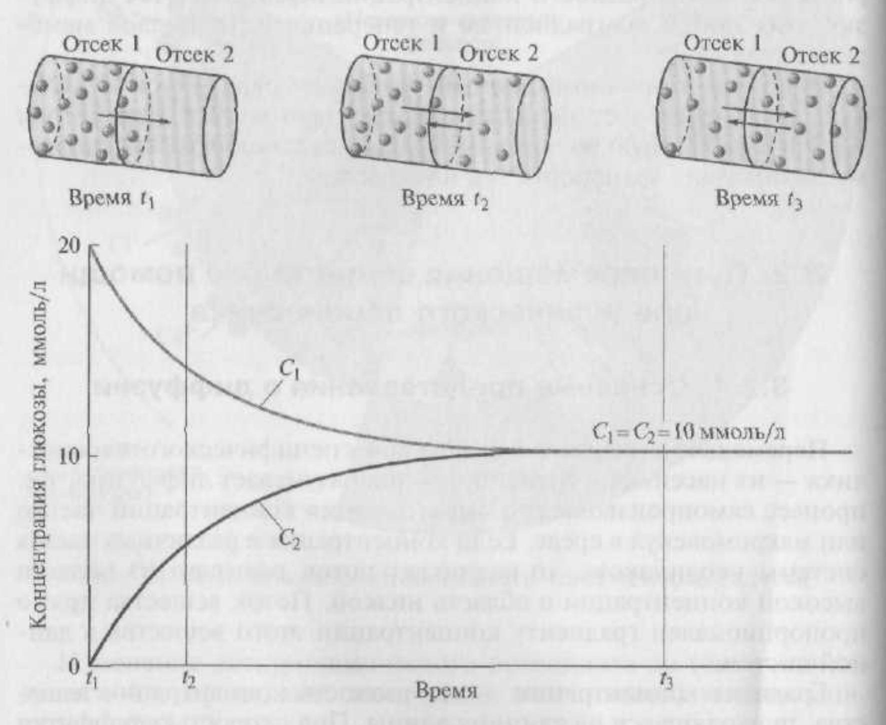


Рис. 3.2. В верхней части рисунка показана диффузия глюкозы между двумя одинаковыми отсеками сосуда *1* и *2*, разделенными воображаемой границей. Начальный период времени t_1 характеризуется наличием глюкозы в отсеке *1* и ее отсутствием в отсеке *2*. Момент времени t_2 характеризуется большим переходом глюкозы из отсека *1* в отсек *2* и меньшим переходом в обратном направлении. В момент времени t_3 устанавливается равновесие между концентрацией глюкозы в отсеке *1* и отсеке *2* сосуда. В нижней части рисунка представлен график, на котором кривая C_1 отражает уменьшение концентрации глюкозы в отсеке сосуда *1*, а кривая C_2 — увеличение концентрации глюкозы в отсеке сосуда *2*. Если исходная концентрация глюкозы C_1 в отсеке сосуда *1* была равна 20 ммоль/л, а в отсеке сосуда *2* C_2 была равна 0 ммоль/л, то через время t_3 концентрации $C_1 = C_2 = 10$ ммоль/л

ется переход молекул вещества в отсек *2*, что на рисунке показано длинной стрелкой. Но при этом отдельные молекулы из отсека *2* будут возвращаться в отсек *1*, что показано короткой стрелкой. В момент времени t_3 в отсеках *1* и *2* находятся по девять молекул растворенного в воде вещества. Наступило равновесие, но из-за теплового хаотичного движения молекул молекулы вещества переходят из отсека *1* в отсек *2* и наоборот, что показано двумя противоположно направленными стрелками.

В принципе диффузия присуща как истинным, так и коллоидным растворам. Она наблюдается не только в жидкостях, но и газах, твердых телах. Растворение веществ также сопровождается диффузией. В растворитель диффундируют отделившиеся от растворяемого вещества частицы — молекулы, ионы.

Математическое описание процесса диффузии дал А. Фик. Если концентрация вещества в различных частях системы неодинакова, то возникает его поток из области высокой концентрации в область низкой. Количественно поток, например, ионов k сорта j_k выражается как масса вещества (или количество вещества), проходящего за единицу времени через поверхность площадью 1 см^2, расположенной перпендикулярно направлению потока:

$$j_k = S\frac{\mathrm{d}m}{\mathrm{d}t},$$

где $\mathrm{d}m$ — масса вещества, переносимая за достаточно малое время $\mathrm{d}t$ через площадь поверхности S.

А. Фик установил, что поток вещества прямо пропорционален градиенту его концентрации в данной точке. Уравнение, связывающее поток и градиент концентрации, является математической записью первого закона Фика и имеет вид

$$\bar{j}_k = -D\,\mathrm{grad}\,C,$$

где постоянная D — коэффициент диффузии, см^2/с; минус указывает на направление потока от бóльших концентраций к меньшим.

Эта одна из важнейших характеристик вещества в данной системе (растворителе) зависит от молекулярной массы самого вещества, вязкости растворителя и температуры. Если диффузия идет в клетке или внеклеточной среде, где главным растворителем является вода, то коэффициент диффузии зависит только от самого вещества и температуры. В самих биологических мембранах диффузия происходит в липидной фазе, которая обладает значительно большей вязкостью, чем вода. Там коэффициент диффузии зависит от состояния липидного бислоя.

Скорость диффузии $\mathrm{d}m/\mathrm{d}t$ прямо пропорциональна градиенту концентрации $\mathrm{d}C/\mathrm{d}x$ (где x — расстояние) и площади S, через которую осуществляется диффузия:

$$\frac{dm}{dt} = -DS\frac{dC}{dx}. \qquad (3.1)$$

Физический смысл коэффициента диффузии легко выяснить, если S и dC/dx приравнять к единице. Коэффициент диффузии численно равен количеству вещества, проходящего в единицу времени через единицу площади при градиенте концентрации, равном единице.

3.2.2. Диффузия через мембрану клетки

Скорость, с которой вещество диффундирует через плазматическую мембрану, может быть определена измерением скорости, с которой внутриклеточная концентрация этого вещества приближается к диффузионному равновесию с его концентрацией во внеклеточной жидкости. Принимая во внимание, что объем внеклеточной жидкости большой, концентрация какого-либо вещества в нем останется, по существу, постоянной, поскольку оно диффундирует в очень маленький (по сравнению с внеклеточным) внутриклеточный объем (рис. 3.3). Как и во всех случаях диффузии, этот поток вещества через мембрану идет от области более высокой концентрации (в этом случае внеклеточная жидкость) к области более низкой (внутриклеточная жидкость).

Диффузия через бислой липидов. Способность веществ проникать в клетку в зависимости от их растворимости в липидах впервые установил Е. Овертон еще в 1895—1899 гг. Он сформулировал

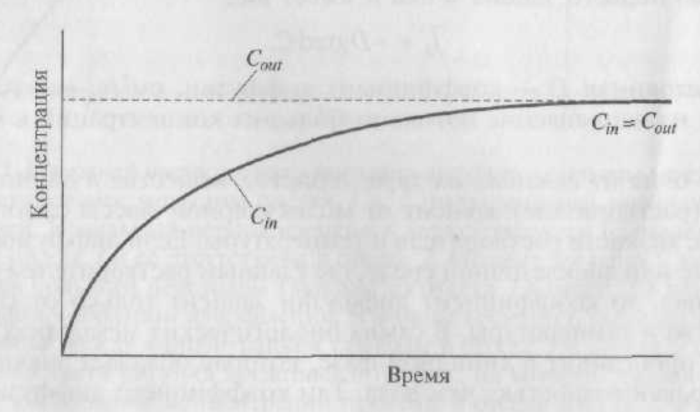


Рис. 3.3. Увеличение внутриклеточной концентрации диффундируемого вещества C_{in} при неизменной внеклеточной концентрации C_{out} вплоть до диффузионного равновесия $C_{in} = C_{out}$. Обратите внимание, что диффузия осуществляется через плазматическую мембрану клетки

два эмпирических правила. Во-первых, проницаемость мембраны клеток для органических молекул уменьшается по мере возрастания в молекулах количества гидроксильных, карбоксильных и аминных групп. Чем больше групп COOH, NH_2 и OH содержат молекулы вещества, тем хуже это вещество проникает в клетку. Во-вторых, проницаемость мембран клеток для органических молекул возрастает по мере увеличения в молекулах количества метиловых, этиловых и фенильных групп.

В 1924 г. М.Х.Джекобс (M.H.Jakobs), исходя из теории электрического строения молекул, дал объяснение правилам Овертона. Он показал, что все химические соединения, а также входящие в их состав отдельные радикалы делятся на две большие группы — полярные и неполярные.

Исследования проницаемости липидного бислоя для органических молекул показали, что она строго зависит от их структуры. Было обнаружено, что полярные молекулы диффундируют через плазматические мембраны в клетку очень медленно, а неполярные — намного быстрее, т.е. имеют бо́льшие константы проницаемости. Бо́льшая скорость диффузии последних объясняется тем, что неполярные молекулы могут растворяться в неполярных областях мембраны, занятых цепями жирных кислот мембранных фосфолипидов.

Напротив, полярные молекулы плохо растворимы в мембранных липидах. Полярные соединения хорошо растворяются в воде и других полярных растворителях и плохо — в неполярных. При увеличении в молекулах органических веществ количества полярных групп их растворимость в липидах понижается, что приводит к уменьшению проницаемости клеток для этих соединений. И наоборот, при уменьшении числа полярных или ионизированных групп увеличиваются растворимость вещества в липидах и их проницаемость через липидную фракцию мембраны. Кислород, углекислый газ, недиссоциированные жирные кислоты и стероидные гормоны — примеры неполярных молекул, которые быстро диффундируют через липидную фракцию мембран. Большинство органических молекул, составляющих промежуточные продукты различных метаболических путей, часто содержат ионизированную группу фосфатов, т.е. являются полярными молекулами. Таким образом, они плохо растворяются в бислое липидов. Большинство этих веществ сохраняется в пределах клеток и органелл, так как не может диффундировать через липидный барьер, который представляет собой мембрана.

К веществам, проникающим в клетку путем растворения в липидах клеточной мембраны, относятся липиды, органические жирные кислоты, различные эфиры и другие малополярные органические соединения. Для них размер молекул не имеет существенного значения. Более крупные, но менее полярные молеку-

лы будут проникать лучше, чем имеющие меньший размер, но более полярные.

Диффузия через ионные каналы мембраны. Если сосуд разделить на две камеры искусственной селективной мембраной — пористой перегородкой, например, стеклянным или керамическим фильтром (рис. 3.4), то скорость диффузии будет зависеть от разности концентраций вещества в камерах, коэффициента диффузии и размеров пор в перегородке.

При изучении реальной мембраны клетки градиент концентрации определить трудно, поэтому его заменяют разностью концентраций. Тогда для описания диффузии веществ через мембраны клеток пользуются уравнением, предложенным Р. Коллендером (R. Collander), являющимся результатом интегрирования уравнения (3.1). Уравнение (3.1) относится к однородной системе, в которой рассматривается градиент концентрации, например в сосуде, не разделенном мембраной, или в самой мембране (в липидной фазе). Если же рассматривается диффузия через мембрану, то путем интегрирования уравнения (3.1) по расстоянию от одной до другой стороны мембраны эта диффузия описывается уравнением

$$\frac{\mathrm{d}m}{\mathrm{d}t} = -PS(C_1 - C_2),$$

где C_1 и C_2 — концентрации вещества по разные стороны мембраны; P — коэффициент проницаемости вещества через мембрану, аналогичный коэффициенту диффузии D.

Коэффициент проницаемости P, так же как и коэффициент диффузии D, зависит не только от свойств вещества и температуры, но и от вязкости, однако D зависит от вязкости в толще липидного бислоя, а P — от вязкости, которая свойственна мембране в целом.

Диффузия через мембрану может осуществляться в обоих направлениях, т. е. как в клетку, так и из нее через ионные каналы, по которым осуществляется обмен ионами между клеткой и внеклеточной средой. В основе проникновения таких ионов, как Na^+,

Низкая концентрация вещества
Мембрана
Высокая концентрация вещества

Рис. 3.4. Диффузия в сосуде, разделенном пористой перегородкой

K^+, Ca^{2+}, Cl^-, через ионные каналы лежат процессы диффузии ионов по градиентам концентрации и электрического поля, о чем речь пойдет далее. Каналы могут находиться в открытом или закрытом состоянии. Это определяется электрическим потенциалом мембраны клетки (для потенциалуправляемых каналов), химическим воздействием на канал и его рецептор (для лигандуправляемых каналов) или механическим воздействием на клетку (для механоуправляемых каналов). Только в том случае, если ионные каналы открыты, ионы могут проходить через них. При этом необходимо отметить, что часть этих каналов высокоселективна, т.е. пропускает только тот сорт ионов, для которых предназначена, тогда как другая не является селективной. Любой неселективный канал, однако, может пропускать только катионы или только анионы. Эти вопросы будут детально рассматриваться при изучении ионных каналов и механизмов их работы.

3.3. Пути перемещения веществ при помощи специфического переносчика

3.3.1. Общая характеристика переносчиков

Определенные молекулы, а также ионы могут проходить через мембрану не путем диффузии, а посредством механизмов, связанных с работой трансмембранных интегральных белков, называемых *переносчиками*. Движение веществ через мембрану при помощи этих транспортных систем зависит от конформационных изменений молекул-переносчиков. К этому виду транспорта относятся облегченная диффузия и активный транспорт. Процесс облегченной диффузии подразумевает перемещение переносчиком вещества через мембрану по градиенту концентрации, тогда как активный транспорт опосредован переносчиком, потребляющим энергию, чтобы переместить вещество против электрохимического градиента. При первично активном транспорте переносчик прямо использует энергию АТФ, а при вторично-активном — разницу концентрации ионов относительно мембраны, на создание и поддержание которой была ранее затрачена энергия АТФ. Ионные насосы, обеспечивающие первично-активный транспорт, могут быть сгруппированы в три класса: P, V и F, из которых мы далее будем рассматривать класс P, включающий Ca^{2+}-АТФазу и Na^+/K^+-АТФазу. Первая поддерживает низкую внутриклеточную концентрацию Ca^{2+}, вторая — низкую концентрацию ионов Na^+ и высокую концентрацию ионов K^+ внутри клетки. Вторично-активный транспорт включает симпорт и антипорт.

Ранее были рассмотрены основные виды пассивного транспорта веществ в клетках. Как отмечалось, при нем перенос веществ че-

рез мембрану клетки осуществляется по электрохимическому градиенту без затраты энергии. Поскольку градиенты клетки имеют тенденцию к уменьшению, пассивный транспорт всегда стремится выровнить неоднородность в распределении ионов между клеткой и средой.

Как отмечалось, диффузия через ионные каналы характерна только для ионов и осуществляется по градиенту концентрации. (Диффузия некоторых веществ через липидный бислой в данном случае в расчет не принимается.) Однако обычная диффузия не подходит для молекул (например, для аминокислот, глюкозы и ряда других), которые слишком полярны, чтобы проходить через бислой, и слишком велики, чтобы проникать через ионные каналы. Поэтому такие молекулы, а также ионы могут переходить через мембрану не посредством обычной диффузии, а посредством механизмов, связанных с работой трансмембранных интегральных белков (переносчиков). Перемещение веществ через мембрану при помощи этих транспортных систем зависит от конформационных изменений самих переносчиков. В предельно упрощенном варианте перенос вещества через мембрану представлен на рис. 3.5. Любой переносчик имеет специфический центр связывания для переносимого вещества (этап 1). Переносимое вещество сначала связывается с этим специфическим центром, т.е. участком, расположенным на той стороне мембраны, которая смотрит

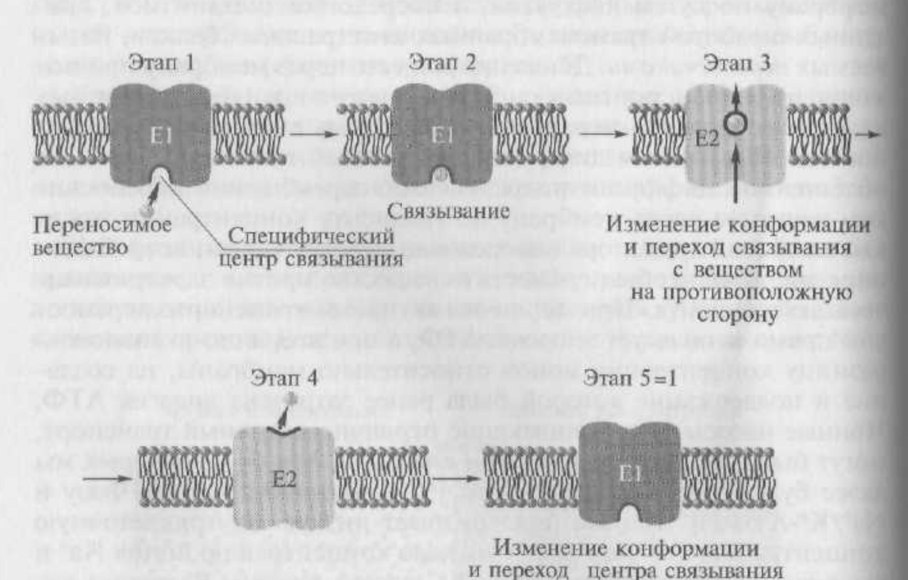


Рис. 3.5. Модель переноса через мембрану вещества при помощи переносчика

в раствор, откуда транспортируется вещество (этап 2). После взаимодействия с переносимым веществом специфический центр связывания в результате изменения конформации переносчика (конформация E1 переходит в конформацию E2) переходит на противоположную сторону мембраны (этап 3), где происходит разобщение переносимого вещества и специфического центра связывания переносчика (этап 4). Перемещение специфического центра связывания в исходное положение за счет перехода конформации E2 в E1 завершает процесс переноса вещества через мембрану (этап 5). Используя этот механизм, не только ионы, но и молекулы могут перемещаться в любом направлении через мембрану клетки.

Схема работы переносчика, показанная на рис. 3.5, — только примитивная модель, так как мы все еще имеем недостаточную информацию относительно определенных изменений конформации любого транспортного белка. Постулируется, что изменения конформации переносчиков аналогичны тем, которым подвергаются белки ионного канала. Стохастические изменения конформации, как предполагается, происходят непрерывно независимо от того, связывается ли переносимое вещество с транспортным белком или нет. Если вещество связывается с переносчиком, то оно перемещается через мембрану, однако его связывание не является необходимым условием для изменения конформации переносчика.

Полагают, что многие из физико-химических характеристик переносчиков и ионных каналов одинаковы. Они являются трансмембранными белками и обладают химической специфичностью. Белки — ионные каналы, однако отличаются от белков-переносчиков по числу ионов, переносимых через мембрану, поскольку ионные каналы перемещают в единицу времени в несколько тысяч раз большее количество ионов, чем переносчики. Частично это отражает факт, что для каждой молекулы, транспортируемой через мембрану, переносчик должен изменить свою конформацию, в то время как открытый ионный канал (изменив конформацию один раз, т.е. открывшись) может поддерживать непрерывный поток ионов без дальнейших изменений конформации.

В мембранах существует много типов переносчиков, каждый из которых имеет специфические места связывания, специфичные для определенных веществ либо классов связываемых соединений. Например, хотя и аминокислоты, и сахар подвергаются переносу с помощью переносчика, белок, транспортирующий аминокислоты, не транспортирует сахар, и наоборот. Этот случай такой же, как и с ионными каналами. Мембраны различных клеток содержат различные типы переносчиков и, таким образом, отличаются по типам транспортируемых веществ и скорости их транспорта.

Три фактора определяют величину потока вещества через систему транспортера:

1) степень насыщения специфических мест связывания переносчика, которая зависит от двух моментов — концентрации вещества и сродства (аффинности) переносчика к веществу;

2) число переносчиков в мембране — чем большее число переносчиков, тем больший поток при любом уровне насыщенности;

3) скорость, с которой происходят конформационные изменения в транспортном белке.

При изменении любого из этих трех факторов перенос с помощью переносчика может быть изменен.

Для любого транспортируемого вещества в конкретной мембране существует конечное число определенных переносчиков в любой момент времени. В условиях увеличения концентрации нуждающегося в транспортировке вещества число занятых специфических мест связывания возрастает, пока все переносчики не станут насыщенными, т.е. пока все специфические места связывания не будут заняты. Когда места связывания переносчика насыщаются, достигается максимальный поток через мембрану, и при дальнейшем увеличении концентрации не произойдет дальнейшее увеличение потока вещества.

Сравним поток вещества, перемещающегося через мембрану при помощи переносчика, с потоком посредством диффузии через липидную фракцию мембраны (рис. 3.6). Поток посредством диффузии увеличивается прямо пропорционально увеличению внутриклеточной концентрации, поскольку диффузия не вовлекает фиксированное число мест связывания. (При очень высоких

Рис. 3.6. Поток молекул, диффундирующих через липидный бислой мембраны (диффузия), увеличивается непрерывно пропорционально внеклеточной концентрации, тогда как поток молекул через транспортную систему переносчика достигает максимальной величины

концентрациях иона, однако, диффузия через ионные каналы может приближаться к значению ограничения из-за фиксированного числа доступных каналов, точно так же как существует верхний предел скорости, по которой толпа людей может проходить через одну открытую дверь.)

Когда *переносчики насыщаются*, максимальный поток зависит от скорости, с которой конформационные изменения в молекуле переносчика могут перемещать их центры связывания с одной стороны на другую. Эта скорость намного медленнее, чем скорость прохождения иона через каналы.

Любое лигандрецепторное взаимодействие можно описать следующей реакцией:

$$\text{Рецептор} + \text{Лиганд} \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{=}} \text{Рецептор} \cdot \text{Лиганд},$$

где k_{on} — константа скорости связывания лиганда с рецептором; k_{off} — константа скорости освобождения лиганда от рецептора.

В состоянии равновесия отношение констант k_{off} к k_{on} есть постоянная величина в соответствии с уравнением

$$K_d = k_{off}/k_{on},$$

где K_d — константа диссоциации, моль.

Для переносчиков связывание вещества происходит снаружи мембраны, а его отщепление — уже внутри клетки. Предположим, что субстанция S находится исходно только с внешней стороны мембраны. В этом случае мы можем написать следующую реакцию:

$$S_{out} + \text{Транспортер} \overset{k_m}{\rightleftarrows} S \cdot \text{Комплекс транспортера} \overset{v_{max}}{\rightleftarrows}$$
$$\rightleftarrows S_{in} + \text{Транспортер},$$

где k_m — константа связывания субстанции с транспортером; v_{max} — скорость максимального транспорта субстанции в клетку.

Если C — наружная концентрация S_{out} (исходная концентрация S_{in} равна 0), то мы можем использовать уравнение Михаэлиса—Ментона

$$v = \frac{v_{max}}{1 + K_m/C},$$

где v — скорость транспорта частиц в клетку; v_{max} — скорость транспорта, если все молекулы транспортера содержат связанную S, что происходит при ее высокой концентрации; K_m — концентрация вещества, при которой полумаксимальный транспорт происходит через мембрану (чем меньше ее величина, тем более тесно

субстанция связывается с транспортером и тем больше скорость транспорта).

Размерность K_m дается в молях. Если переносчик имеет низкую аффинность, у K_m высокие значения, и наоборот.

До этого момента мы описывали перенос посредством переносчиков так, как если бы все переносчики имели подобные свойства. На практике выделяют два типа транспорта — облегченную диффузию и активный транспорт. Облегченная диффузия использует переносчик, чтобы переместить вещество из области более высокой концентрации к области более низкой, т.е. по градиенту концентрации, тогда как активный транспорт использует переносчик, требующий энергию, чтобы переместить вещество из области низкой в область высокой концентрации раствора через мембрану, т.е. против его электрохимического градиента.

Поскольку детальное обсуждение переносчиков выходит за рамки настоящего издания, рассмотрим их сразу более подробно, чтобы не возвращаться к этому вопросу.

3.3.2. Облегченная диффузия

Термин «облегченная диффузия» возник потому, что конечный результат диффузии и облегченной диффузии одинаков. В обоих процессах поток незаряженных молекул через мембрану всегда идет от высокого уровня концентрации к низкому и продолжается, пока концентрации на двух сторонах мембраны не станут равными. Однако в переносе веществ с помощью облегченной диффузии участвует переносчик (рис. 3.7). Ни диффузия, ни облегченная диффузия не требуют энергетических затрат, и, таким образом, эти процессы не способны к перемещению вещества через мембрану от более низкого к более высокому уровню концентрации.

Самым ярким примером облегченной диффузии в организме является транспорт глюкозы через плазматическую мембрану в разных типах клеток. Без таких переносчиков поступление глюко-

Рис. 3.7. Облегченная диффузия

ы в клетки было бы практически невозможным, поскольку она является относительно большой полярной молекулой. Можно было ожидать, что в результате облегченной диффузии концентрация глюкозы внутри клетки станет равной внеклеточной, однако в большинстве клеток этого не происходит, потому что глюкоза превращается в глюкозу-6-фосфат почти так же быстро, как поступает в клетку. Таким образом, внутриклеточная концентрация глюкозы остается более низкой, чем внеклеточная, и имеется градиент, обеспечивающий непрерывный поток глюкозы в клетку.

Известно несколько разных для каждого типа клеток переносчиков, осуществляющих облегченную диффузию глюкозы через мембрану. Каждый из этих переносчиков кодируется различными генами, которые экспрессируются в различных типах клеток. Переносчики различны по аффинности их мест связывания с глюкозой, максимальной скорости транспорта, скорости насыщения и модуляции их транспортного действия различными химическими сигнальными соединениями, например молекулами гормона инсулина. Хотя глюкоза поступает во все клетки посредством своих переносчиков, инсулин воздействует только на тип переносчика глюкозы, находящегося прежде всего в мышечной и жировой тканях. Инсулин увеличивает число переносчиков глюкозы в мембране и, следовательно, скорость движения глюкозы в клетки.

3.3.3. Активный транспорт

Активный транспорт отличается от облегченной диффузии тем, что использует энергию для осуществления перемещения вещества через мембрану из области низкой концентрации в область высокой, т.е. против электрохимического градиента вещества (рис. 3.8).

Активный транспорт требует связывания транспортируемого вещества с переносчиком мембраны. Поскольку эти переносчики перемещают вещество против градиента концентрации, они на-

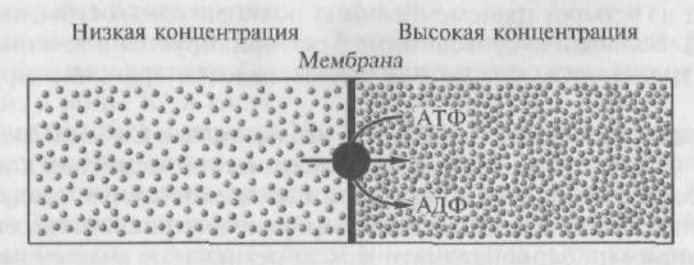


Рис. 3.8. Активный транспорт

зываются насосами. Переносчики, обеспечивающие активный транспорт, специфичны для транспортируемого вещества и насыщаемы, т.е. их поток максимален, когда все специфические места связывания с переносимым веществом заняты.

Движение от более низкой до более высокой концентрации и обеспечение поддержания установившейся концентрации на одной стороне мембраны могут быть достигнуты только непрерывным энергетическим обеспечением транспортного процесса. Эта энергия может:

1) изменять аффинность центра связывания на транспортере так, чтобы аффинность связывания на одной стороне мембраны была более высокой, чем на другой;

2) изменять скорости, с которыми центр связывания на переносчике сдвигается от одной поверхности до другой.

Еще раз отметим, что перемещение молекулы от более низкой концентрации (более низкое энергетическое состояние) к более высокой (более высокое энергетическое состояние) требует энергетического обеспечения, поэтому активный транспорт должен быть связан с одновременным переходом некоторого источника энергии от более высокого энергетического уровня к более низкому энергетическому уровню. Для активного транспорта известно два варианта использования переносчиками энергии:

1) прямое потребление АТФ в первично-активном транспорте;

2) использование градиента концентрации ионов относительно мембраны, созданного первично-активным транспортом, для управления процессом вторично-активного транспорта.

Первично-активный транспорт. Рассмотрим АТФ-энергетические насосы (АТФазы), которые транспортируют ионы против их концентрационного градиента. Ионные насосы могут быть сгруппированы в три класса — P, V и F — на основании особенностей их молекулярной организации. Их основные структуры показаны на рис. 3.9, а свойства коротко суммированы в табл. 3.1. Все три класса АТФаз имеют одно или более мест связывания с АТФ на цитозольной поверхности мембраны.

Ионные насосы класса P — самые простые по структуре: они состоят из четырех трансмембранных полипептидных субъединиц — 2α и 2β. Большая α-субъединица фосфорилируется в течение процесса транспорта, сквозь нее перемещаются транспортируемые ионы.

Первый тип насосов класса P — это несколько Ca^{2+}-АТФаз. Одна из Ca^{2+}-АТФаз расположена в плазматической мембране клетки и транспортирует ионы Ca^{2+} из клетки во внеклеточную среду. Другие Ca^{2+}-АТФазы расположены в мембране внутриклеточных структур, например, саркоплазматическом ретикулуме мышечных клеток. Они транспортируют ионы Ca^{2+} из цитоплазмы в саркоплаз-

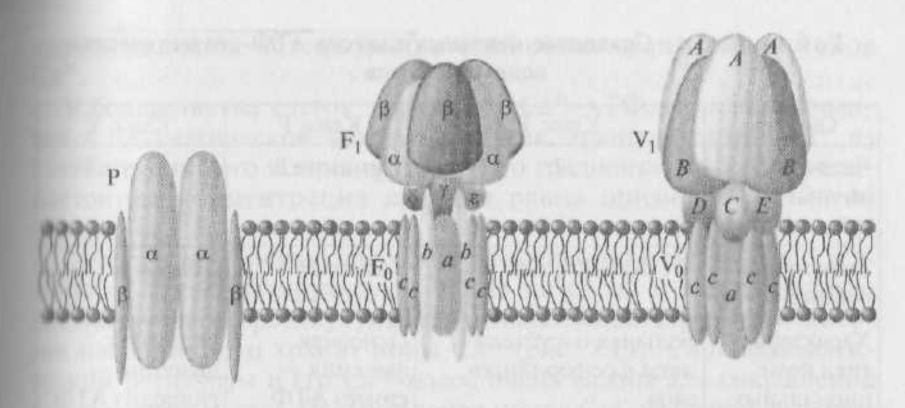


Рис. 3.9. Три класса АТФ-зависимых ионных насосов. P-класс насосов — тетрамер, состоящий из двух различных полипептидов (α и β). Все насосы P-класса будут фосфорилированными в промежуточных звеньях транспортного цикла; последовательность аминокислот вокруг фосфорилированного остатка, которая находится в большой α-субъединице, является гомологичной для различных насосов. V- и F-классы насосов не формируют фосфопротеины как промежуточные звенья транспортного цикла, и ни одна из их субъединиц не похожа на субъединицы P-класса насосов. Однако две цитозольные субъединицы и две трансмембранные субъединицы в V- и F-классах насосов имеют гомологию. Каждая пара соответственных субъединиц, как полагают, развивается от общего полипептида

матический ретикулум. Некоторые Ca^{2+}-АТФазы находятся в мембране ряда внутриклеточных органелл, в которые они транспортируют ионы Ca^{2+}. Благодаря работе Ca^{2+}-АТФаз концентрация ионов Ca^{2+} в цитоплазме поддерживается на значительно меньшем уровне, чем во внеклеточной среде.

Вторым типом насосов класса P является насос, сопрягающий транспорт Na^+ и K^+, который выкачивает три иона Na^+ из клетки, одновременно вводя два иона K^+ в клетку против его электрохимического градиента. Таким образом, возникнет негативный внутриклеточный потенциал мембраны клетки (потенциал покоя клетки). Основой такого электрогенного Na^+/K^+-насоса является Na^+/K^+-АТФаза, которая расположена исключительно в плазматической мембране клетки.

Третий тип насоса класса P найден в некоторых секретирующих кислоту клетках. Он транспортирует протоны (ионы H^+) из клетки, а ионы K^+ в клетку.

Ионные насосы классов V и F сходны по структуре друг с другом, но не гомологичны с классом P. Все известные типы этих двух классов насосов транспортируют только протоны. Насосы класса F включают в себя, по крайней мере, три вида трансмембранных белков, а насосы класса V — два вида. Оба класса содержат как минимум пять видов внеклеточных полипептидов. Две

Таблица 3.1. **Сравнение основных классов АТФ-энергетических ионных насосов**

Свойство	Класс P	Класс F	Класс V
Число различных типов субъединиц	2	Минимум 8	Минимум 7
Транспортируемые ионы	H^+, Na^+, K^+, Ca^{2+}	Только H^+	Только H^+
Характеристика функциональных особенностей	Большая α-субъединица фосфорилирована	Основная функция — синтез АТФ	Основная функция — гидролиз АТФ
Локализация специфических насосов	Плазматическая мембрана грибов и бактерий (H^+-насос); плазматическая мембрана высших эукариотов (Na^+/K^+-насос); плазматическая мембрана клеток желудка млекопитающих (H^+/K^+-насос); плазматическая мембрана всех эукариотных клеток (Ca^{2+}-насос); Саркоплазматический ретикулум мембраны мышечной клетки (Ca^{2+}-насос)	Плазматическая мембрана бактерий; внутренняя мембрана митохондрий	Мембраны вакуолей; эндосомальные и лизосомальные мембраны; некоторые плазматические мембраны

трансмембранные субъединицы и две внешние субъединицы в классе F насосов гомологичны с такими же у класса V.

В физиологии рассматриваются в основном насосы класса P. Это связано с тем, что разница концентраций ионов во внутриклеточной и внеклеточной средах создается и поддерживается при помощи механизма активного транспорта ионов, который затрачивает метаболическую энергию для выведения некоторых ионов против их электрохимических градиентов.

Роль Ca^{2+}-АТФазы. Одним из типов класса P является Ca^{2+}-АТФаза, часто называемая Ca^{2+}-насосом. Она поддерживает концентрацию свободных ионов Ca^{2+} в пределах от 10^{-7} до $2 \cdot 10^{-7}$ М. Необходимо отметить, что не все цитозольные ионы Ca^{2+} свободны. Некоторые из них связаны с отрицательными зарядами молекул фосфатов, оксалатов или АТФ. Но главным для работы

клетки является концентрация свободных несвязанных ионов Ca^{2+}.

У большинства клеток эукариотов Ca^{2+}-АТФаза, локализованная в плазматической мембране клеток, транспортирует Ca^{2+} из клетки против его концентрационного градиента, поскольку внеклеточная концентрация кальция равна примерно $3 \cdot 10^{-3}$ М (рис. 3.10).

Мышечные клетки содержат вторую, отличающуюся Ca^{2+}-АТФазу, транспортирующую Ca^{2+} из цитозоля в полость *саркоплазматического ретикулума, внутриклеточной структуры*, которая накапливает и хранит ионы Ca^{2+} (рис. 3.11). Саркоплазматический ретикулум и его Ca^{2+}-насос очень важны для сокращения и релаксации мышц. Освобождение ионов Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума в цитозоль мышечной клетки вызывает сокращение, а быстрое удаление ионов Ca^{2+} из цитозоля Ca^{2+}-насосом — расслабление мышц.

Кальциевый насос в мышцах. Поскольку мышечный *Ca^{2+}-насос составляет более чем 80 % интегральных протеинов в* мембране саркоплазматического ретикулума, его легко выделить, очистить и охарактеризовать.

Одиночный трансмембранный α-полипептид с молекулярной массой 100 000 обладает активностью Ca^{2+}-АТФазы и транспортирует два иона Ca^{2+} при гидролизе одной молекулы АТФ до АДФ, причем для формирования комплекса с АТФ требуется Mg^{2+}. (В большей части ферментативных реакций, в которых АТФ игра-

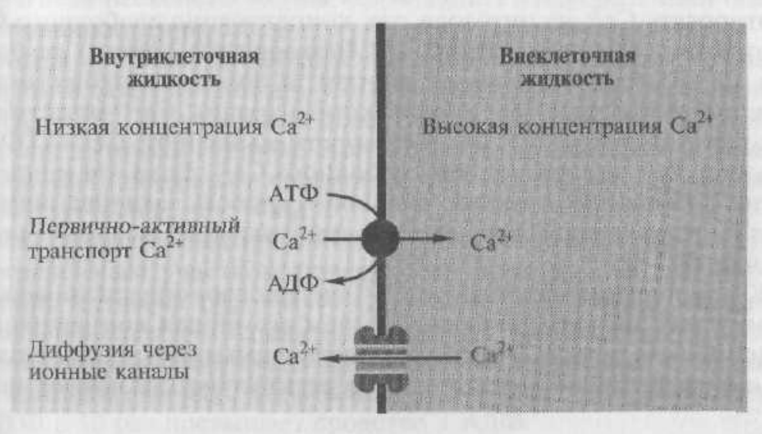


Рис. 3.10. Локализованная в плазматической мембране клеток Ca^{2+}-АТФаза транспортирует Ca^{2+} из клетки во внеклеточную среду против его концентрационного градиента. По градиенту Ca^{2+} поступает в клетку благодаря диффузии через ионные каналы (еще один путь устранения ионов Ca^{2+} из клетки против градиента концентрации будет рассматриваться в конце этой главы как вторично-активный транспорт)

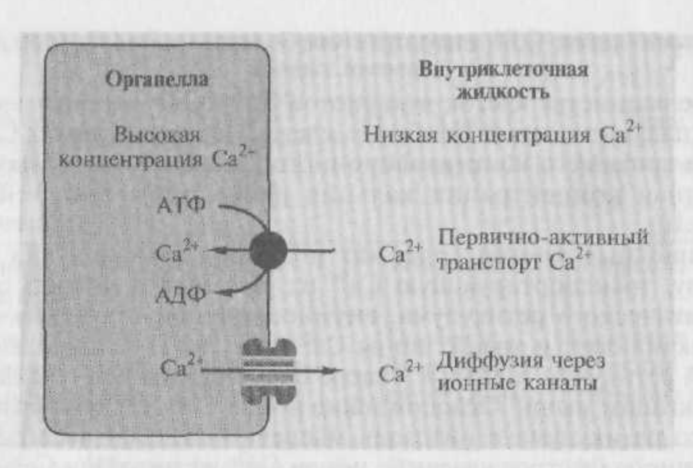


Рис. 3.11. Локализованная в мембране саркоплазматического ретикулума клеток Ca^{2+}-АТФаза, транспортирует Ca^{2+} из цитозоля в полость саркоплазматического ретикулума против градиента концентрации. По градиенту Ca^{2+} выходит благодаря диффузии через ионные каналы

ет роль донора фосфата, участвует активная форма АТФ, а именно — комплекс Mg^{2+}-АТФ.) Функции и даже существование β-субъединицы спорны.

Крайне высокая аффинность центров связывания этого фермента для ионов Ca^{2+} ($K_m = 10^{-7}$ М) на поверхности, обращенной в цитозоль, позволяет ему очень эффективно связывать и транспортировать Ca^{2+} из цитозоля, где концентрация свободного Ca^{2+} находится в диапазоне от 10^{-7} М (покоящиеся клетки) до более чем 10^{-6} М (сокращающаяся клетка), в полость саркоплазматического ретикулума, где общая концентрация Ca^{2+} может быть высокой, достигая 10^{-2} М. Активность мышечной Ca^{2+}-АТФазы регулируется концентрацией свободного Ca^{2+}. Если эта концентрация становится слишком высокой, скорость закачивания Ca^{2+} увеличивается до тех пор, пока его концентрация не станет меньше чем 10^{-6} М.

Концентрация свободного Ca^{2+} внутри саркоплазматического ретикулума значительно меньше, чем его общая концентрация, максимально равная 10^{-2} М. Два растворимых протеина в полостях везикул саркоплазматического ретикулума связывают ионы Ca^{2+}.

Первый, кальсеквестрин (calsequestrin), молекулярной массой 44 000 с сильно выраженными кислотными свойствами: 37 % его остатков — это аспарагиновая и глутаминовая кислоты. Каждая молекула кальсеквестрина связывает 43 иона Ca^{2+} с величиной K_m, примерно равной $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Второй — высокоаффинный Са-связывающий протеин — имеет более низкую валентность для

ионов Ca^{2+}, но высокую аффинность ($K_m = 3 \cdot 10^{-6}—4 \cdot 10^{-6}$ моль/л) по сравнению с кальсеквестрином. Такие протеины работают как резервуары для внутриклеточного Ca^{2+}, снижая концентрацию свободных ионов Ca^{2+} в везикулах саркоплазматического ретикулума и соответственно уменьшая энергию, необходимую для закачивания ионов Ca^{2+} внутрь этих везикул из цитозоля.

Кальциевый насос в плазматической мембране. Плазматическая мембрана животных, дрожжевых и, возможно, растительных клеток содержит Ca^{2+}-АТФазы, которые транспортируют ионы Ca^{2+} из цитозоля во внеклеточный раствор. Во многих случаях активность этих ферментов стимулируется повышением в цитозоле свободного Ca^{2+}, вызванного, например, гормонной стимуляцией. Связывающий кальций регуляторный протеин кальмодулин (calmodulin) является существенной субъединицей Ca^{2+}-АТФазы эритроцита и других Ca^{2+}-АТФаз плазматической мембраны. Подъем в цитозольном Ca^{2+} приводит к связыванию ионов Ca^{2+} с кальмодулином, который запускает аллостерическую активность Ca^{2+}-АТФазы. Как результат этого экспорт ионов Ca^{2+} из клетки ускоряется и восстанавливается исходно низкая концентрация свободного Ca^{2+} в цитозоле (примерно $1 \cdot 10^{-6}$ М).

Молекулярный механизм работы Ca^{2+}-АТФаз. Механизм работы Ca^{2+}-АТФазы в мембране саркоплазматического ретикулума в настоящее время хорошо известен во всех деталях, поскольку можно было изолировать его пузырьки. Он включает в себя несколько этапов, проходящих в определенной последовательности (рис. 3.12).

Когда протеин находится в исходной конформации E1, сначала один и затем второй ион Ca^{2+} связываются с высокоаффинными ($K_m = 10^{-7}$ М) участками поверхности протеина, обращенной в сторону цитозоля (этап 1). Ионы Mg^{2+} не влияют на связывание ионов Ca^{2+}, поскольку сродство к Ca^{2+} у центров связывания в 30 000 раз выше, чем у Mg^{2+}.

После связывания ионов Ca^{2+} Mg^{2+}-АТФ связывается с другим определенным участком поверхности протеина, обращенной в сторону цитозоля ($K_m = 2 \cdot 10^{-5}$ М) (этап 2). В интактной клетке лишь очень незначительное количество АТФ и АДФ содержится в виде свободных анионов. В основном эти соединения представлены комплексами Mg^{2+}-АТФ и Mg^{2+}-АДФ. При этом сродство Mg^{2+} к АТФ в 10 раз превышает сродство к АДФ.

Таким образом, оба лиганда (ионы Ca^{2+} и комплекс Mg^{2+}-АТФ) присоединены к разным центрам на поверхности молекулы протеина, обращенной в сторону цитозоля. Низкое значение K_m ионов Ca^{2+} ($K_m = 10^{-7}$ М) свидетельствует о том, что даже при низкой концентрации ионов Ca^{2+} значительная часть их будет связана с насосом.

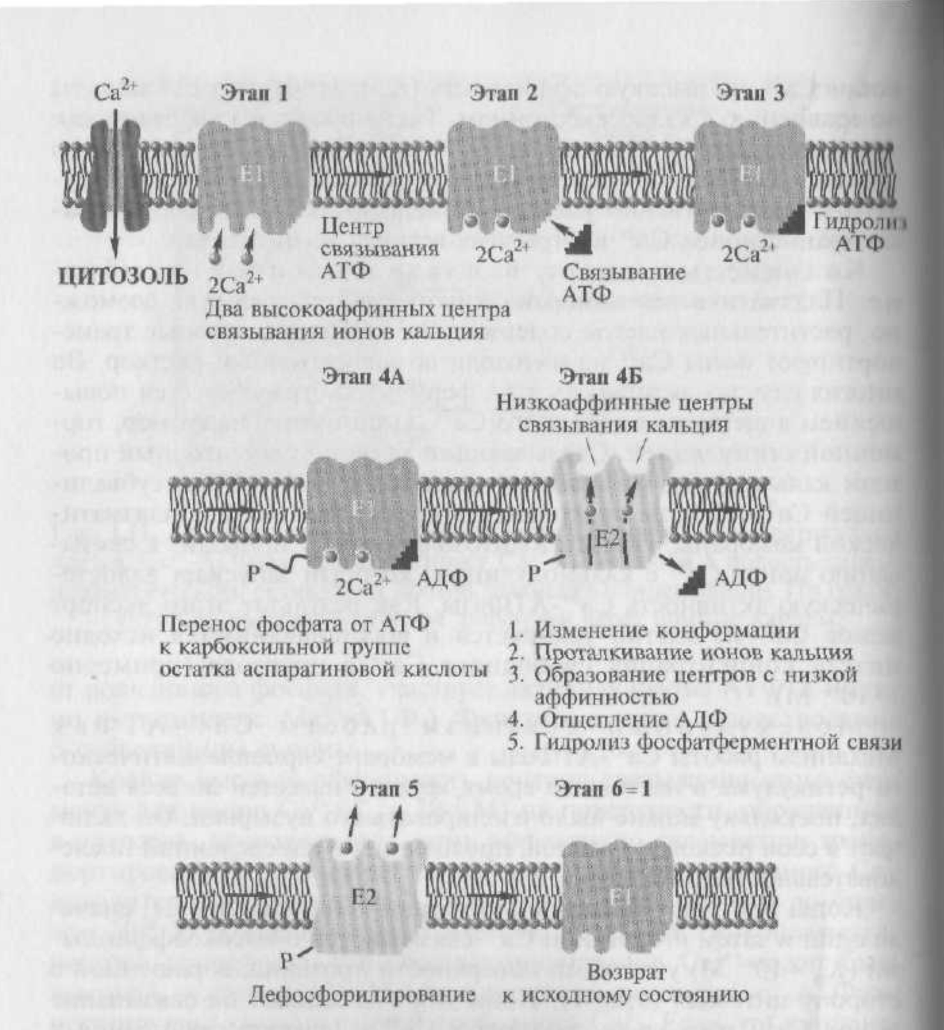


Рис. 3.12. Механизм работы Ca^{2+}-АТФазы в мембране саркоплазматического ретикулума

Одновременное присутствие на своих местах связывания ионов Ca^{2+} и Mg^{2+}-АТФ (этап 3) запускает следующий этап — гидролиз АТФ. При этом освобожденный фосфат (концевая фосфатная группа в АТФ) переносится от АТФ к карбоксильной группе остатка аспарагиновой кислоты протеина (фосфорилирование белка по карбоксильной группе аспарагиновой кислоты), формируя высокоэнергетическую ацилфосфатную связь. Происходит образование фосфорилированного протеина (или ферментфосфатного комплекса), отмеченного как E1~P (этап 4А). На этом этапе, однако, возможно обратное преобразование АДФ в АТФ. Константа K_m образовавшегося АДФ с ферментфосфатным комплексом (E1~P)

составляет примерно $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л и практически совпадает с константой K_m связывания АТФ с ферментом ($K_m = 2 \cdot 10^{-5}$ М). Другими словами, больших затрат или выигрыша в энергии при переходе комплекса протеина с АТФ в комплекс протеина с АДФ не происходит. Свободная энергия гидролиза АТФ (около 40 кДж на 1 М) *потратилась на образование комплекса E1~P* (фосфорилирование фермента) с высокоэнергетической ацилфосфатной связью (символ «~Р» обозначает высокоэнергетическую ацилфосфатную связь). Таким образом, связь фосфата в фосфорилированном белке также богата энергией, которая высвобождается при ее гидролизе.

Фосфорилирование протеина запускает преобразование E1 в E2. (Протеин меняет свою конформацию, и это дает возможность обозначить комплекс как E2-P, подразумевая, что E2 по сравнению с E1 имеет другую конформацию.) Процесс изменения конформации протеина происходит мгновенно после его фосфорилирования, поэтому мы называем этот этап как этап 4Б, выделяя его для лучшего понимания процесса. Это изменение конформации протеина ведет к одновременному проталкиванию двух ионов Ca^{2+} на другую сторону протеина и соответственно мембраны (транслокация). При переходе двух ионов Ca^{2+} высокоэнергетическая ацилфосфатная связь теряет макроэргическую энергию. Она превратилась в изменение сродства к Ca^{2+} (на четыре порядка). В результате этого изменения энергии фосфатной связи из АДФ уже не получить АТФ. Эта конформация протеина уже не имеет центров с крайне высокой аффинностью для ионов *Ca^{2+} на поверхности фермента, обращенной в цитозоль. При* транслокации ионов к поверхности протеина, которая смотрит в полость саркоплазматического ретикулума, образуются два центра связывания со слабой аффинностью для ионов Ca^{2+}. Одновременно с проталкиванием ионов Ca^{2+} через протеин в результате изменения конформации белка произойдет отщепление АДФ.

Вместе с тем переход ионов на другую сторону протеина сам по себе еще не завершает процесс. Необходима энергия, чтобы ионы оторвались от центров связывания. В конечном счете она также обусловлена гидролизом АТФ. Как отмечалось, в результате гидролиза образуется комплекс E1~P с макроэргической фосфатной связью, а само высвобождение энергии происходит в результате изменения характера связи фосфатной группы с ферментом (т. е. перехода ~P в –P). Эта энергия, ранее сосредоточенная в макроэргической фосфатной связи, расходуется и на изменение константы связывания ионов Ca^{2+} с ферментом. Константа K_m становится равной примерно 10^{-3} М. С энергетической точки зрения это означает изменение энергии связывания, т. е. два иона Ca^{2+} уходят от поверхности протеина (этап 5).

Естественно, что для повторения цикла требуется еще одно конформационное изменение протеина. Дефосфорилирование завершает переход E2 в E1. Изменение конформации вызывает образование высокоаффинных центров связывания с ионами Ca^{2+} на поверхности протеина, обращенной в сторону цитозоля. Низкоаффинные центры связывания с Ca^{2+} на противоположной стороне протеина в этой конформации отсутствуют (этап 6 = 1).

Таким образом, в целом свободная энергия гидролиза АТФ и высокоэнергетической ацилфосфатной связи обеспечивает все эти процессы. Поскольку только E2-P, а не E1~P фактически гидролизован, свободная энергия гидролиза связи фосфата с карбоксильной группой остатка аспарагиновой кислоты протеина в комплексе E1~P больше, чем у E2-P. Высвобождение энергии происходит именно на этапе изменения характера связи фосфатной группы с ферментом: связь становится обычной низкоэнергетической (E2-P). Заметим, что при этом символ «–P» обозначает низкоэнергетическую фосфорэфирную связь. Уменьшение свободной энергии связи остатка аспарагиновой кислоты фосфата в E2-P относительно E~P может, как считают, обеспечивать конформационный переход.

Роль Na^+/K^+-АТФазы. Второй тип насосов класса P, который был изучен в деталях, — это Na^+/K^+-АТФаза, присутствующая в плазматических мембранах. Она была растворена и очищена от мембранной фракции у нескольких типов клеток животных, например клеток почек млекопитающих и электрических органов угря (тканей, очень богатых этим ферментом). Этот ионный насос представляет собой тетрамер $2\alpha2\beta$. Полипептид β (молекулярная масса 50 000) представляет собой трансмембранный гликопротеин, который требуется для того, чтобы заново синтезируемая α-субъединица свернулась должным образом. Но полипептид β, очевидно, не вовлекается впрямую в перенос ионов. Субъединица α (молекулярная масса 120 000) — это полипептид, чья аминокислотная последовательность и предсказанная структура в мембране очень сходны с Ca^{2+}-АТФазой саркоплазматического ретикулума в мышце. В частности, Na^+/K^+-АТФаза имеет «стебель» на цитозольной стороне, с которым связаны домены, содержащие связывающие АТФ участки и фосфорилированный аппарат. Общий процесс транспортного движения трех свободных ионов натрия из клетки и двух ионов калия в клетку на молекулу АТФ продемонстрирован на рис. 3.13.

Экспериментальные результаты свидетельствуют о том, что Na^+/K^+-АТФаза ответственна за взаимосвязанное движение ионов натрия и калия соответственно из клетки и в клетку. Например, сильная взаимосвязь между током ионов натрия и калия через плазматическую мембрану и активность Na^+/K^+-АТФазы наблюдалась в мембране различных тканей. Кроме того, вещество ouаба-

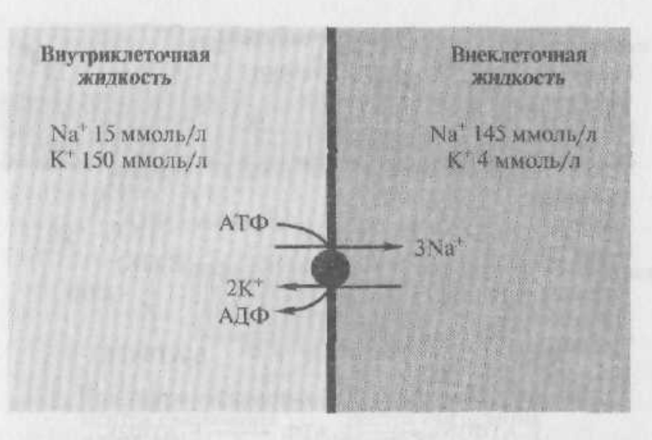


Рис. 3.13. Локализованная в плазматической мембране клеток Na^+/K^+-АТФаза транспортирует $3Na^+$ из клетки во внеклеточную среду против его концентрационного градиента и $2K^+$ из внеклеточной среды в клетку против его концентрационного градиента

ин, которое связывается со специфическим регионом на экзоплазматической поверхности протеина, специфически ингибирует Na^+/K^+-АТФазу, а также предотвращает поддержание натрий-калиевого баланса клетками.

Механизм действия Na^+/K^+-АТФазы подобен механизму Ca^{2+}-АТФазы. Полный механизм переноса включает в себя несколько этапов работы, которые проходят в определенной последовательности, представленной на рис. 3.14.

На рис. 3.14 показаны общие особенности механизма переноса. На внутриклеточной стороне мембраны Na^+/K^+-АТФаза находится в конформации, называемой E1. Эта конформация имеет специфические катионсвязывающие центры, имеющие высокую аффинность и к ионам Na^+, и к АТФ (приблизительно $0{,}2 \cdot 10^{-6}$ моль/л). Внутри клетки три иона Na^+ связываются с белком в конформации E1, предварительно связанным с Mg^{2+}-АТФ с образованием комплекса [E1АТФ3Na^+]. Связывание ионов Na^+ катализирует фосфорилирование. Фосфорилирование переводит белок в форму E1P. В ней он может быть дефосфорилирован АДФ в обратимой реакции, описанный как обмен АТФ ⇔ АДФ. Однако когда АДФ уходит, ионы Na^+, связанные с ферментом, теперь в нем «запечатаны» в форме [E1P(3Na^+)].

Стехиометрическое «запечатывание» транспортируемых ионов — ключевой аспект активного катионного транспорта. Именно в таком виде в белке происходит конформационный переход, определяющий перенос ионов на противоположную сторону мембраны. Ионы Na^+ покидают белок на внеклеточной поверхности (первый ион более быстро, а второй и третий более медленно), и

Рис. 3.14. Схема механизма переноса ионов Na^+ и K^+ с помощью Na^+/K^+-АТФазы

ферментфосфатный комплекс [E2P] больше не чувствителен к добавлению АДФ, но чувствителен к водному гидролизу. Эта форма белка в виде [E2P] связывает два иона K^+ на внешней поверхности с образованием комплекса [$E2P2K^+$]. Связывание ионов приводит к дефосфорилированию фермента. На внутренней поверхности P_i освобождается, и ионы K^+ становятся «запечатанными» [$E2(2K^+)$], чтобы осуществился перенос. Освобождение ионов K^+ во внутриклеточный раствор должно катализироваться АТФ, связывающейся с местом с низкой аффинностью (приблизительно $150 \cdot 10^{-6}$ М) с образованием комплекса [$E2АТФ(2K^+)$]. Фермент возвращается из E2 к форме E1 с низкой аффинностью к ионам K^+[$E1АТФ2K^+$] (процесс, управляемый разницей в энергии связывания для АТФ). Ионы K^+ покидают комплекс на внутренней поверхности, в результате чего образуется комплекс [E1ATP]. Теперь белок готов начать новый цикл.

Весь этот процесс представлен на рис. 3.15. Рассмотрим его более детально.

Когда протеин находится в исходной конформации, называемой E1, его сторона, обращенная в цитозоль, имеет три высокоаффинных места для связывания ионов Na^+. При этом другой определенный участок поверхности протеина, обращенной в сторону цитозоля, уже связан с Mg^{2+}-АТФ (этап 1). Сначала один, а затем второй и третий ионы Na^+ связываются с высокой аффинностью с определенными участками поверхности протеина, обращенной в сторону цитозоля (этапы 2 и 3). Константа связыва-

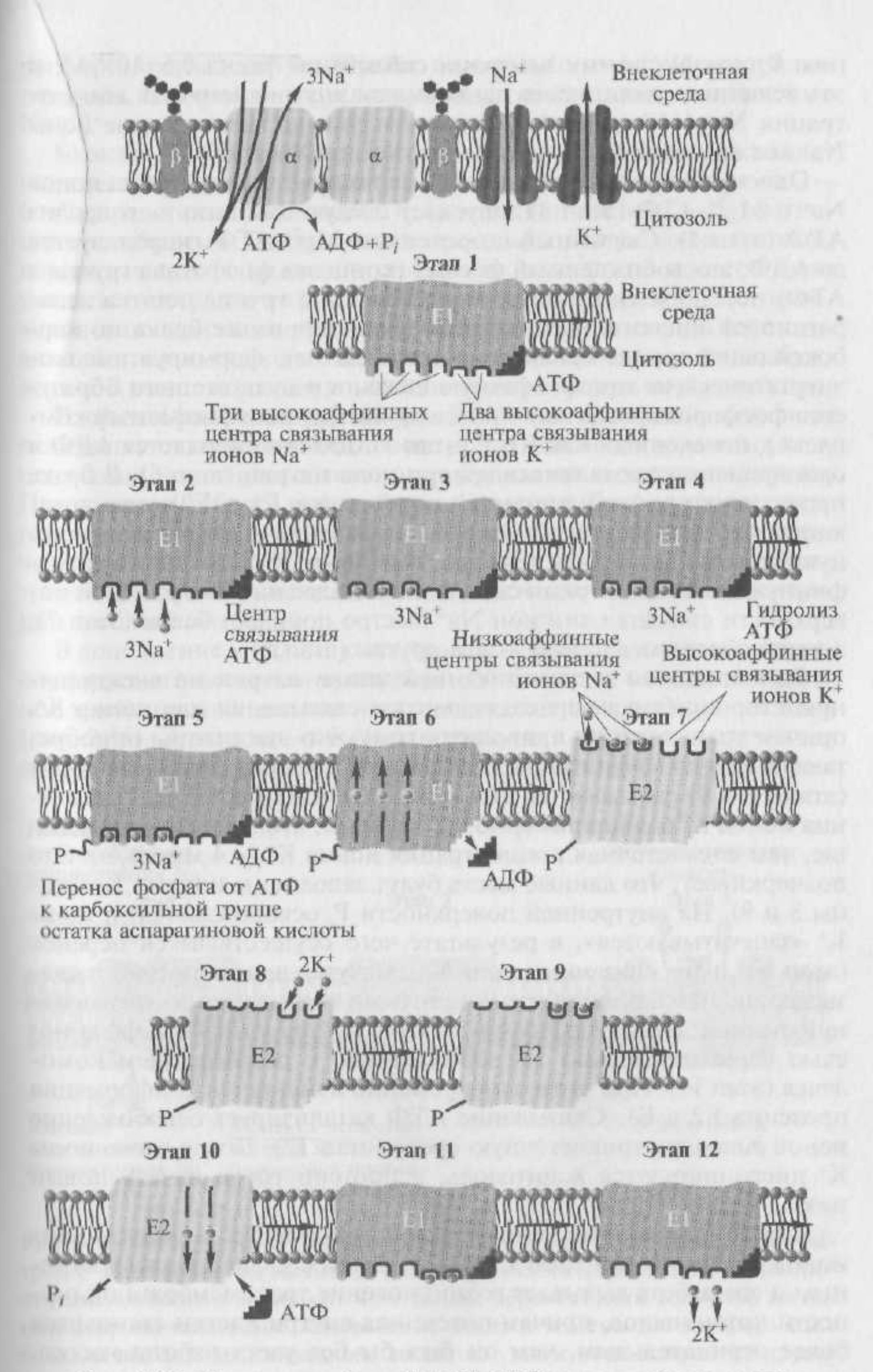


Рис. 3.15. Механизм работы Na^{+}/K^{+}-АТФазы в мембране клетки

ния K_m для Na^+ этими центрами связывания равна $0{,}6 \cdot 10^{-3}$ М, и эта величина значительно меньше, чем внутриклеточная концентрация Na^+ (≈12 ммоль/л). Это подчеркивает, что в норме ионы Na^+ должны заполнять центры связывания (этап 3).

Одновременное присутствие на своих местах связывания ионов Na^+ и Mg^{2+}-АТФ (этап 3) запускает следующий этап — гидролиз АТФ (этап 4). Связанный с протеином Mg^{2+}-АТФ гидролизуется до АДФ, а освобожденный фосфат (концевая фосфатная группа в АТФ) переносится от нее к карбоксильной группе остатка аспарагиновой кислоты протеина (фосфорилирование белка по карбоксильной группе аспарагиновой кислоты), формируя высокоэнергетическую ацилфосфатную связь, в результате чего образуется фосфорилированный протеин (или ферментфосфатный комплекс), отмеченный как E1~P (этап 5). Далее отщепляется АДФ и одновременно проталкиваются три иона натрия (этап 6). В белке происходит конформационный переход (от E1 к E2), определяющий перенос ионов и центров связывания на противоположную сторону мембраны, причем там ионы Na^+ имеют низкоаффинную связь с центрами связывания. Далее на внеклеточной поверхности сначала один ион Na^+ быстро покидает белок (этап 7), а затем, более медленно, — два других (этап 8).

Одновременно с транслокацией ионов натрия на внеклеточную сторону белка переходят центры связывания для ионов K^+, причем транслокация приводит к тому, что эти центры приобретают высокую аффинность для ионов K^+ (этап 7). Именно с ними (этапы 8 и 9) связываются два иона K^+. В этих местах K_m связывания ионов K^+ равна примерно 0,2 ммоль/л, что значительно меньше, чем внеклеточная концентрация ионов K^+ (≈ 4 ммоль/л). Это подчеркивает, что данные места будут заполнены ионами K^+ (этапы 8 и 9). На внутренней поверхности P_i освобождается, и ионы K^+ «запечатываются», в результате чего осуществляется перенос (этап 10) и два связанных иона K^+ движутся через протеин и связываются с низкоаффинными центрами связывания на цитозольной стороне. Далее АТФ связывается с местом с низкой аффинностью (приблизительно $150 \cdot 10^{-6}$ моль/л) с образованием комплекса (этап 11). При этом одновременно изменяется конформация протеина E2 в E1. Связывание АТФ катализирует освобождение ионов K^+ во внутриклеточную среду (этап 12). После этого ионы K^+ диссоциируются в цитозоль, а протеин готов начать новый цикл.

Коэффициент сопряжения удаляемых ионов Na^+ и поступающих ионов обычно равен трем к двум, т.е. насос является электрогенным и его работа вызывает возникновение трансмембранной разности потенциалов, причем потенциал внутри клетки становится более отрицательным, чем он был бы без учета работы насоса, исходя только из градиентов концентраций ионов и относитель-

ных проницаемостей мембраны или только диффузионного потенциала. В нормальных условиях вклад потенциала, создаваемого Na^+/K^+-насосом, составляет несколько милливольт.

Блокада Na^+/K^+-АТФазы первое время незначительно влияет на потенциал покоя. Возникает небольшая деполяризация на 2—6 мВ, представляющая вклад V_p (потенциал насоса) в V_m (потенциал мембраны). Однако через несколько минут после блокады потенциал покоя медленно снижается вследствие постепенного уменьшения градиентов концентраций ионов. В результате увеличения деполяризации уменьшается скорость нарастания потенциала действия и, следовательно, скорость распространения возбуждения. В конце концов происходит полная потеря возбудимости.

Вторично-активный транспорт. Вторично-активный транспорт отличается от первично-активного использованием градиента концентрации ионов относительно мембраны как источника энергии. Поток ионов от более высокой концентрации (более высокое энергетическое состояние) к более низкой (более низкое энергетическое состояние) обеспечивает энергию для движения активно транспортируемого вещества из области его низкой концентрации в область высокой.

В дополнение к наличию центра связывания для активно транспортируемого вещества транспортный белок во вторично-активной транспортной системе также имеет центр связывания для иона (*рис. 3.16*). *Этот ион — обычно натрий, но в некоторых случаях —* другой типа бикарбоната, хлорида или калия. Связывание иона с

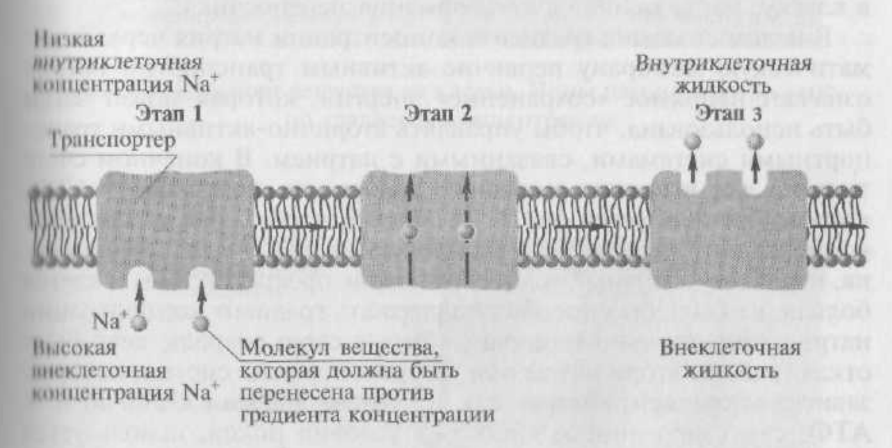


Рис. 3.16. Модель вторично-активного транспорта. Связывание иона натрия с транспортером вызывает аллостерические изменения в аффинности связывающего активного центра для переносимого вещества на одной стороне мембраны. Связывание ведет к изменению конформации белка и выходу как связанного вещества, так и иона натрия на другой стороне мембраны

вторично-активным переносчиком вызывает изменения в переносчике, подобные тем, что происходят при первично-активном транспорте, а именно:

1) изменение аффинности центра связывания на переносчике для транспортируемого вещества;

2) изменения скорости, с которой центр связывания на переносчике перемещается от одной поверхности до другой.

Обратите внимание, что при первично-активном транспорте транспортный белок изменен ковалентной связью фосфата с транспортным белком; во вторично-активном транспорте изменения структуры вызваны за счет аллостерического эффекта в результате связывания иона.

Существует очень важная непрямая связь между вторично-активными переносчиками, которые используют натрий, и первично-активным переносчиком натрия Na^+/K^+-АТФазой. Напомним, что внутриклеточная концентрация натрия намного ниже, чем внеклеточная, потому что его первично-активный транспорт при помощи Na^+/K^+-АТФазы выносит натрий из клетки. Из-за низкой внутриклеточной концентрации натрия немногие центры связывания натрия на вторично-активном транспортном белке заняты на внутриклеточной поверхности переносчика. Это различие обеспечивает асимметрию в транспортных потоках, ведя к движению против градиента концентрации транспортируемого вещества. В то же время ион натрия, который связывается с переносчиком на внеклеточной поверхности, движется по градиенту концентрации в клетку, когда меняется конформация переносчика.

В целом создание градиента концентрации натрия через плазматическую мембрану первично-активным транспортом натрия означает непрямое «сохранение» энергии, которая может затем быть использована, чтобы управлять вторично-активными транспортными системами, связанными с натрием. В конечном счете энергия для вторично-активного транспорта получена от АТФ, который используется Na^+/K^+-АТФазой, чтобы создать градиент концентрации натрия. Если бы продукция АТФ была ингибирована, первично-активный транспорт натрия прекратился бы и клетка больше не была бы способна поддержать градиент концентрации натрия относительно мембраны. Это, в свою очередь, вело бы к отказу работы вторично-активных транспортных систем, которые зависят от градиента натрия как источника энергии. От 10 до 40 % АТФ, синтезированного клеткой в условии покоя, используется Na^+/K^+-АТФазой, чтобы поддержать градиент натрия, который, в свою очередь, управляет множеством вторично-активных транспортных систем.

Как обсуждалось, энергия, сохраненная в градиенте концентрации иона относительно мембраны, может также использоваться, чтобы синтезировать АТФ из АДФ и P_i.

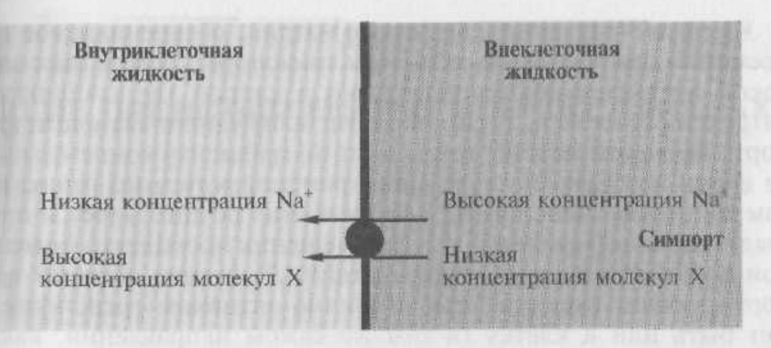


Рис. 3.17. Симпорт вещества в клетку. Ионы натрия идут в клетку по градиенту концентрации

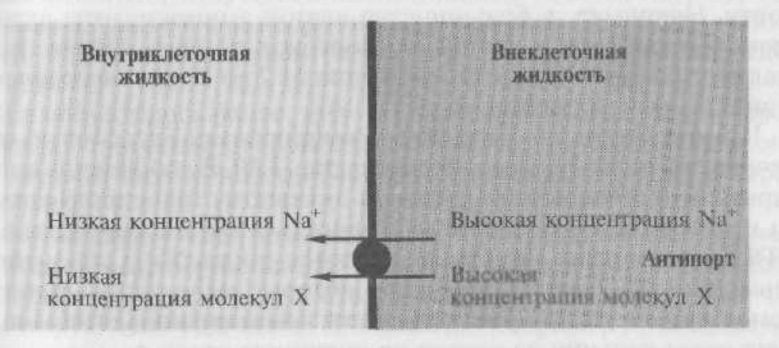


Рис. 3.18. Антипорт вещества из клетки. Ионы натрия идут в клетку по градиенту концентрации

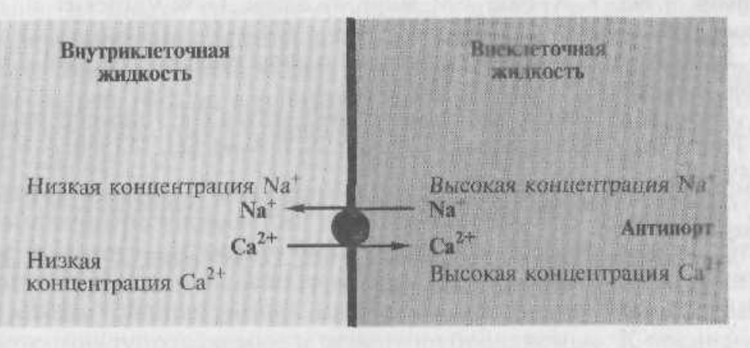


Рис. 3.19. Вторично-активный транспорт ионов кальция во внешнюю среду. Ионы натрия идут в клетку по градиенту концентрации

Как отмечено ранее, движение натрия, обеспечиваемое переносчиком при вторично-активном транспорте, всегда идет от высокой внеклеточной концентрации в клетку, где концентрация натрия более низкая. Таким образом, во вторично-активном транспорте движение натрия всегда идет по градиенту концентрации, в то время как движение активно транспортируемого вещества на том же самом транспортном белке всегда осуществляется против градиента концентрации, т. е. перемещения проходят от более низкой до более высокой концентрации. Движение активно транспортируемого вещества при вторично-активном транспорте может быть или в клетку (в том же самом направлении, как натрий), тогда этот процесс называется *симпортом* (рис. 3.17), или из клетки (против направления движения натрия), тогда это называется *антипортом* (рис. 3.18).

В различных органах молекулы и некоторые ионы движутся через мембрану благодаря натрийсвязанному вторично-активному транспорту. Например, в большинстве клеток аминокислоты активно транспортируются в клетку симпортом с ионами натрия, повышая внутриклеточную концентрацию от 2 до 20 раз по сравнению с внеклеточным раствором.

Пример вторично-активного транспорта ионов, который обеспечивается натрием, представлен на рис. 3.19. В дополнение к предварительно описанному первично-активному транспорту кальция из цитозоля во внеклеточную жидкость и органеллы через Ca^{2+}-АТФазу во многих мембранах имеются также Na^{+}/Ca^{2+}-антипортеры (или Na^{+}/Ca^{2+}-обменники), которые используют движение ионов натрия в клетку по градиенту концентрации, чтобы выводить ионы кальция из клетки во внешнюю среду.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Hilge M. ATP-induced conformational changes of the nucleotide-binding domain of Na, K-ATPase / M. Hilge, G. Siegal, G. W. Vuister et al. // Nat. Struct. Biol. — 2003. — V. 10(6). — P. 468 — 474.

Jencks W. P. How does a calcium pump pump calcium? // J. Biol. Chem. — 1989. — V. 264. — P. 18855 — 18858.

Jencks W. P. On the mechanism of ATP-driven Ca^{2+} transport by calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1980. — V. 671. — P. 49 — 56.

Laeuger P. Electrogenic ion pumps / P. Laeuger. — Sunderland, MA : Sinauer Associates, 1991.

Molecular cell biology / ed. by H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk et al. — 3rd ed. — N.Y. : Freeman and Company, 1995.

ГЛАВА 4

ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ИОННЫХ КАНАЛАХ

4.1. Принципы структурной организации ионных каналов

Как известно, искусственный липидный бислой, не содержащий белка, фактически непроницаем для ионов. Это указывает на то, что белковый компонент мембраны ответственен за проведение ионов.

Как обсуждалось ранее, интегральные мембранные белки пронизывают липидный бислой. Некоторые из них формируют ионные каналы, сквозь которые ионы могут диффундировать через мембраны.

Ионный канал — это белковая структура на основе мембранной α-субъединицы, образованная доменами и имеющая вид, подобный пончику (рис. 4.1, *а*) с отверстием в середине — порой, через которую движутся ионы. Для многих, например потенциалуправляемых, каналов характерно наличие четырех доменов. Диаметры поры очень маленькие. Они лишь несколько больше, чем диаметры ионов, которые через них проходят. Это предотвращает вход в них больших полярных органических молекул. Каждый домен последовательно связан друг с другом пептидной петлей и состоит из шести трансмембранных сегментов, которые также последовательно связаны друг с другом (рис. 4.1, *б*). Поперечный срез такого канала может быть представлен в виде, показанном на рис. 4.1, *в*, а планометрическое изображение одного домена, состоящего из шести сегментов (S1—S6) представлено на рис. 4.1, *г*.

Главный принцип классификации всех ионных каналов основан на принципе управления работой канала, т.е. механизме, на основе которого он может быть закрытым или открытым. Этот механизм в русском переводе вошел в литературу как механизм *ворот канала* (channel gating). Выделяют две группы ионных каналов: потенциалуправляемые и рецепторуправляемые. К последней относятся две подгруппы: лигандуправляемые и механоуправляемые.

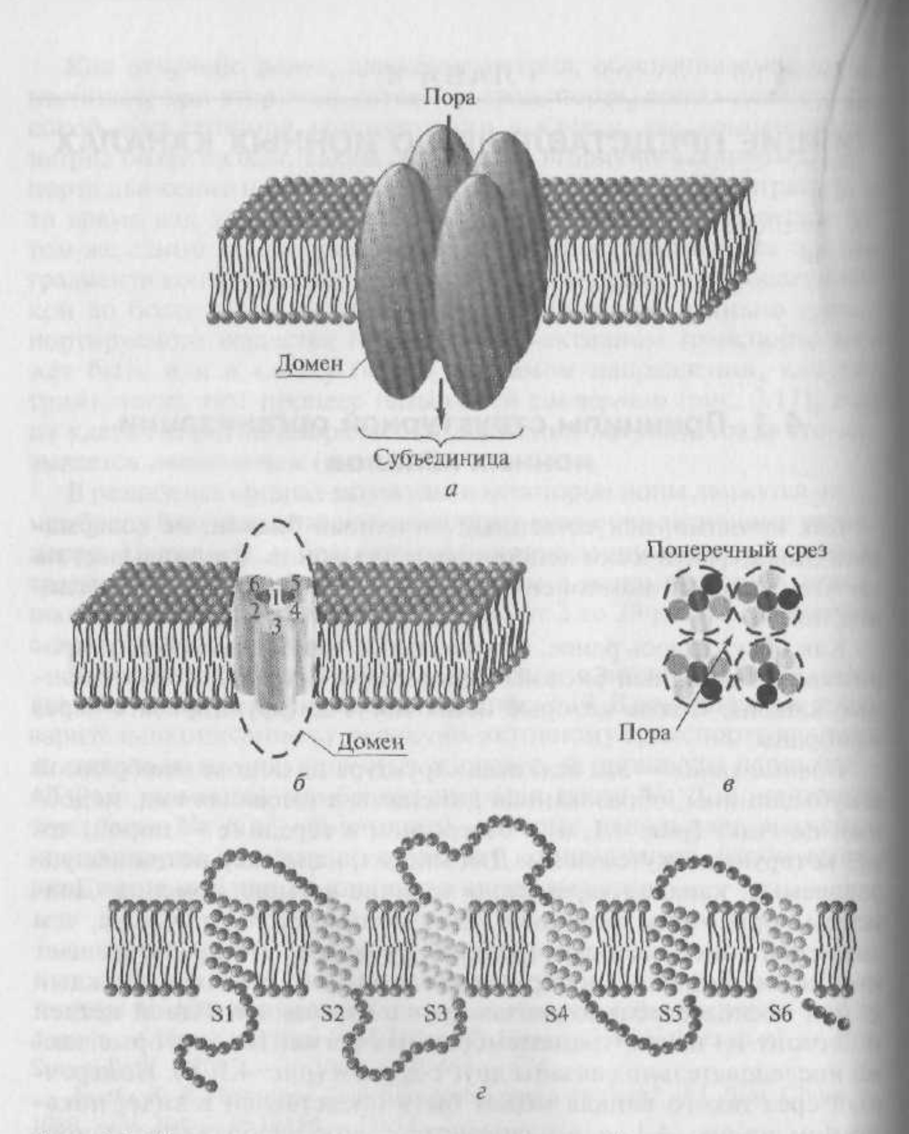


Рис. 4.1. Принципиальная модель молекулярной организации ионного канала на основе порообразующей мембранной α-субъединицы, состоящей из четырех доменов:

а — ионный канал, состоящий из четырех доменов, которые формируют стенки поры; *б* — структура одного из доменов. На схеме шесть трансмембранных α-спиральных сегментов представлены в виде цилиндров и схематически объединены вместе, как это принято; связи между сегментами не показаны; *в* — поперечный срез ионного канала, каждый из четырех доменов которого имеет шесть трансмембранных сегментов; *г* — один домен ионного канала, построенный интегральным мембранным белком, содержащим шесть трансмембранных сегментов (S1—S6), каждый из которых имеет α-спиральную конфигурацию в пределах мембраны

Потенциалуправляемые ионные каналы открываются и закрываются в результате изменения мембранного потенциала клетки. Внутри каналов находятся так называемые ворота, т.е. белковые структуры, которые могут открывать или закрывать канал. Отсюда и пошло название — «механизм ворот канала». Лигандуправляемые ионные каналы меняют свою проводимость в результате конформационных изменений белка канала после его связывания со специфической молекулой — лигандом. Наконец, механоуправляемые ионные каналы раскрываются или закрываются в результате изменения натяжения мембраны, переданного преимущественно через цитоскелет, вследствие механического воздействия на клетку.

Другой принцип классификации ионных каналов — по их селективности. По существу все ионные каналы селективны для ионов, которые они пропускают. Эта селективность основана частично на диаметре канала и частично связана с заряженными и полярными поверхностями белка, которые формируют стенки канала и электрически притягивают или отталкивают ионы. Ряд каналов, например калиевые (K^+-каналы), позволяют проходить только ионам калия, другие селективны для ионов натрия (Na^+-каналы). Разумеется, существуют ионные каналы, проводящие и другие ионы. Тем не менее есть и неселективные ионные каналы.

Таким образом, мембрана обладает широким набором каналов, например применительно к ионам Na^+: потенциалуправляемые Na^+-каналы, лигандуправляемые Na^+-каналы, механоуправляемые Na^+-каналы. Более того, потенциалуправляемые Na^+-каналы (как и потенциалуправляемые каналы, проводящие ионы K^+ или Ca^{2+}) могут различаться по величине потенциала, которая изменяет их проводимость. Лигандуправляемые Na^+-каналы различаются по химическому соединению — трансмиттеру или вторичному мессенджеру, который определяет их проводимость. Наконец, механоуправляемые каналы, могут различаться по принципу — открываются ли они при растяжении мембраны или, наоборот, закрываются при этом.

В настоящее время принята специальная классификация, основанная на генетическом анализе, о чем речь пойдет в следующих главах. Хотя молекулярная организация и механизмы работы многих каналов недостаточно хорошо изучены, остановимся на тех, которые точно определены и вошли не только в научную, но и учебную литературу.

4.2. Каналы утечки

Каналы утечки представляют собой особую группу ионных каналов. Это одни из немногих каналов, о которых около 50 лет, т.е.

со времени их открытия, было мало что известно. Они имеют потенциалнезависимую основу и калий-натриевую проводимость. В работах Б. Хилле (B. Hille) отмечается, что уже А. Ходжкин и А. Хаксли на фоне потенциала покоя демонстрировали небольшой компонент тока, приписываемый ими так называемому току утечки I_l (leak current). Этот ток был маленький и имел потенциалнезависимый механизм ионной проводимости. А. Ходжкин и А. Хаксли не выявили ионную основу тока утечки. Было показано, что на фоне потенциала покоя мембрана клетки относительно проницаема для ионов калия и крайне плохо проницаема для ионов натрия. Эту проницаемость и в настоящее время традиционно приписывают потенциалнезависимой и нечувствительной к тетратиламмонию утечке.

Белковая структура канала утечки, через которую в состоянии покоя клетки осуществляется выход ионов K^+ и вход ионов Na^+, в настоящее время, по-видимому, определена (см. подразд. 11.8). Еще А. Ходжкин и А. Хаксли назвали эту структуру каналом утечки. С такими каналами связывают формирование потенциала покоя. Механизм избирательной проницаемости мембраны в покое для ионов K^+ и Na^+ точно еще не известен. Акцент делается на утечку ионов K^+, потому что в среднем каналы в 100 раз более проницаемы для ионов K^+, чем для Na^+. Как же каналы утечки вносят вклад в потенциал покоя клетки?

Как сообщалось ранее, потенциал покоя клетки определяется работой Na^+/K^+-АТФазы и потоком ионов Na^+ и K^+ именно по каналам утечки. Первично-активный транспорт, определяемый электрогенным Na^+/K^+-насосом, поддерживает распределение ионов Na^+ и K^+ и удерживает внутри клетки концентрацию Na^+ на низком, а концентрацию K^+ — на высоком уровне, транспортируя Na^+ из клетки наружу, а K^+ — из наружной среды внутрь. Равновесный потенциал для ионов Na^+ равен +55 мВ, а потенциал мембраны клетки лежит в диапазоне от −60 до −80 мВ. В этом случае существует движущая сила для ионов Na^+, и они устремляются внутрь клетки по каналам утечки, что должно было бы приводить к деполяризации ее мембраны. Однако напомним, что каналы утечки мало проницаемы для ионов Na^+, поэтому их небольшой вход в клетку не может эффективно использовать ее мембрану. Как отмечалось, каналы утечки в значительной степени проницаемы для ионов K^+ (поэтому их часто называют просто калиевыми каналами утечки). Для ионов K^+ сохраняется электрохимический градиент, направленный из внутриклеточной области к внеклеточной среде. Поскольку равновесный потенциал ионов K^+ равен примерно −90 мВ, через мембрану по каналам утечки одновременно с небольшим выходом ионов Na^+ в значительно большем количестве выходят ионы K^+, противодействуя незначительной деполяризации, обусловленной крайне малым входящим током ионов Na^+.

4.3. Потенциалуправляемые ионные каналы

4.3.1. Общие представления о потенциалуправляемых ионных каналах

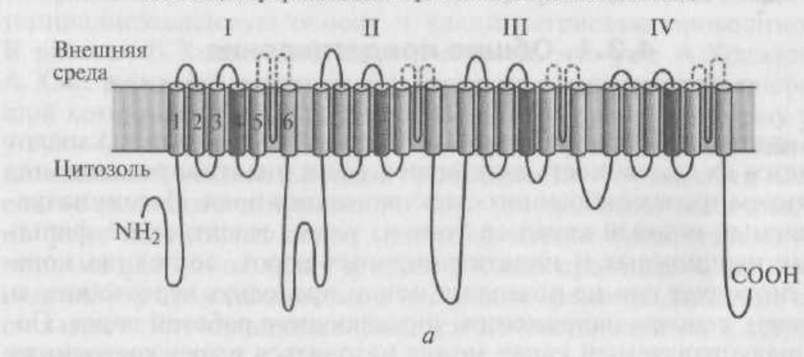
Характерной чертой потенциалуправляемых ионных каналов является их способность активироваться и инактивироваться под влиянием трансмембранного электрического поля. Потенциалуправляемый ионный канал состоит из устья, селективного фильтра, активационных и инактивационных ворот, состояние которых позволяет или не позволяет ионам проходить через канал, и, наконец, сенсора напряжения, управляющего работой ворот. Потенциалуправляемый канал может находиться в трех состояниях: *покоя, активации и инактивации. Обычно эти каналы селективны* для каждого сорта ионов.

К группе потенциалуправляемых ионных каналов прежде всего относятся потенциалуправляемые Na^+-, K^+- и Ca^{2+}-каналы с проводимостью для ионов Na^+, K^+ и Ca^{2+}. Хотя существует большое количество типов каждого из этих каналов, принципиальные схемы молекулярной организации для каждого из них определены. Эти схемы в наиболее упрощенном виде представлены на рис. 4.2, на котором представлена только порообразующая структура. Мы вернемся к вопросу о молекулярной организации каждого из типов этих каналов в соответствующих главах, посвященных детальному анализу работы каждого из них.

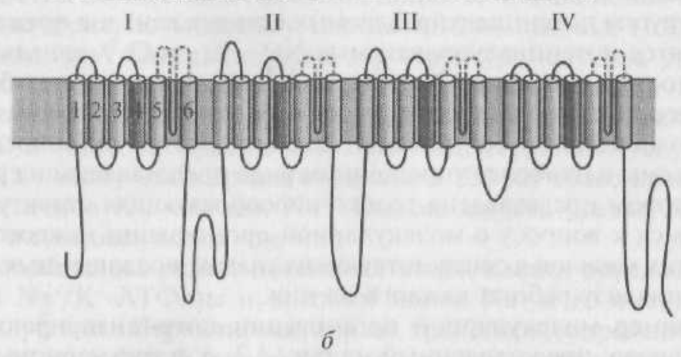
Пример молекулярной организации потенциалуправляемого Na^+-канала, представленный на рис. 4.2, *а*, в трехмерном изображении продемонстрирован на рис. 4.3.

Рассмотрим структуру потенциалуправляемых ионных каналов на примере потенциалуправляемого Na^+-канала, упрощенная модель которого представлена на рис. 4.4. Ионный канал включает в себя несколько важнейших структур и в том числе устье канала, обращенное в сторону, откуда в него поступает ион (в данном случае внешняя сторона мембраны), селективный фильтр, который оценивает сорт иона; активационные и инактивационные ворота, которые могут перекрывать канал для прохождения ионов, и, наконец, сенсор напряжения, который управляет работой канала. (Хотя для многих ионных каналов показано большее количество ворот канала, мы будем обсуждать их работу только с позиций активационных и инактивационных ворот.)

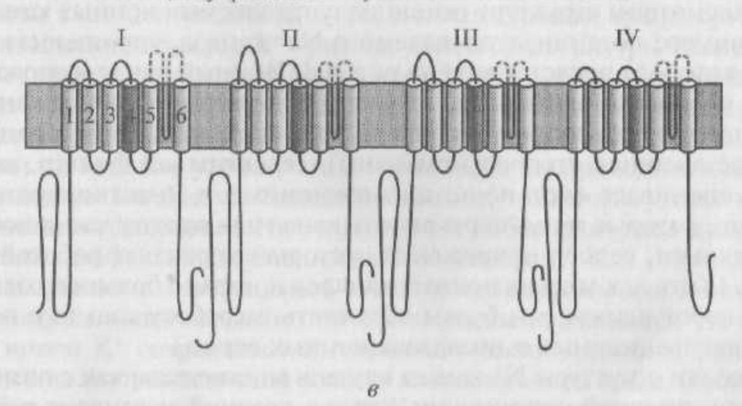
Все эти структуры N^+-канала изучали многие годы как с позиций их молекулярной организации, так и с позиций механизма работы каждой из них и всех в совокупности, т.е. как единого целого. Хотя в последние годы в представлениях о Na^+-каналах достигнут значительный прогресс, мы еще очень далеки от истинного понимания механизмов работы как канала в целом, так и каждой его структуры.


Потенциалуправляемый протеин ионного канала Na^+
I
II
III
IV
Внешняя среда
1
2
3
4
5
6
Цитозоль
NH_2
COOH

а


Потенциалуправляемый протеин ионного канала Ca^{2+}
I
II
III
IV
1
2
3
4
5
6

б


Потенциалуправляемый протеин ионного канала K^+
I
II
III
IV
1
2
3
4
5
6

в

Рис. 4.2. Трансмембранные порообразующие структуры трех потенциалуправляемых ионных каналов:

а — порообразующая структура потенциалуправляемого Na^+-канала содержит 1 800—2 000 аминокислот; *б* — приблизительно 29 % остатков идентичны в пептидной последовательности потенциалуправляемого Ca^{2+}-канала; другие 36 % остатков в обоих белках имеют одинаковые боковые цепочки. Белковая цепь Na^+- и Ca^{2+}-каналов имеет четыре гомологичных домена I—IV, каждый из которых содержит шесть α-спиралей (1—6) и неспиральную петлю P (обозначенную пунктирной линией), которая принимает участие в формировании самой поры вместе с трансмембранными сегментами S5 и S6. Одна α-спираль в каждом домене (S4, затемненная) сама или, по-видимому, со своим окружением S1 — S4 функционирует как сенсор напряжения; *в* — по подобному принципу построен потенциалуправляемый K^+-канал

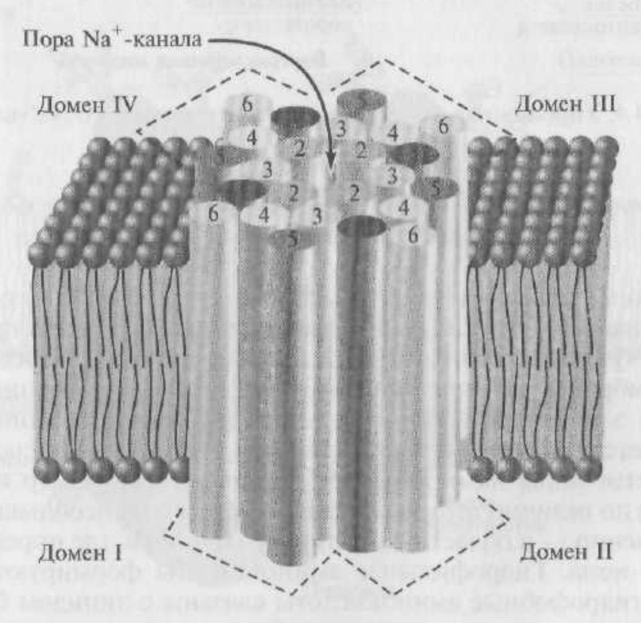


Рис. 4.3. Трехмерное изображение упаковки четырех доменов порообразующей α-субъединицы потенциалуправляемого Na^+-канала, каждый из которых содержит шесть пронумерованных на рисунке трансмембранных сегментов. Сама пора представлена полым цилиндрическим отверстием в центре упаковки. Связи между сегментами не показаны

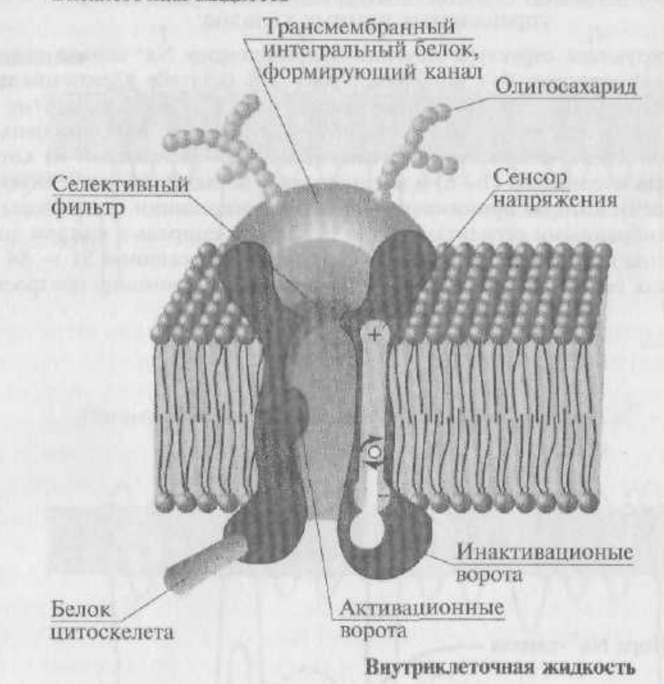


Рис. 4.4. Упрощенная модель потенциалуправляемого Na^+-канала

4.3.2. Активация и инактивация потенциалуправляемых каналов

Наиболее простая и широко известная схема работы потенциалуправляемого Na^+-канала показана на рис. 4.5. Канал представлен как трансмембранный белок, находящийся в липидном бислое мембраны, но прикрепленный к другим мембранным белкам или элементам внутриклеточного цитоскелета. Когда канал открывается, формируется водная пора, проходящая через мембрану. Устье поры намного более широкое, чем размер иона, но сужается до величин атомных размеров только на небольшом участке, а именно — в области селективного фильтра, где определяется природа иона. Гидрофильные аминокислоты формируют стенку поры, а гидрофобные аминокислоты связаны с липидом бислоем.

В настоящее время механизм работы ворот канала уже достаточно изучен. Одним из первых его попытался описать в 1971 г. Б. Хилле. Согласно его точке зрения, основанной на экспериментах А. Ходжкина и А. Хаксли и собственных работах, в ответ на действие электрического раздражителя, т. е. изменение трансмемб-

ранного потенциала, происходит изменение конформации белка потенциалуправляемого канала. Эти конформационные изменения регулируются электрическим полем внутри мембраны, носят стохастический характер и протекают за время от 30 мкс до 10 мс. Важно, что для открытия и закрытия канала не требуются высокоэнергетические химические соединения. Каналы открываются при одних и закрываются при других трансмембранных потенциалах. Было высказано предположение, что электрическое поле действует на сенсор напряжения, который определяет трансмембранный потенциал. Затем сенсор напряжения должен передать эту информацию на саму канальную молекулу для ее конформационного изменения и соответствующего изменения частоты открытия и закрытия канала.

В 1992 г. Б. Хилле предположил, что изменения конформации происходят в результате общего перераспределения заряда в макромолекуле, образующей канал, и выражаются в виде открытия или закрытия ворот канала (см. рис. 4.5). Иначе говоря, возмож-

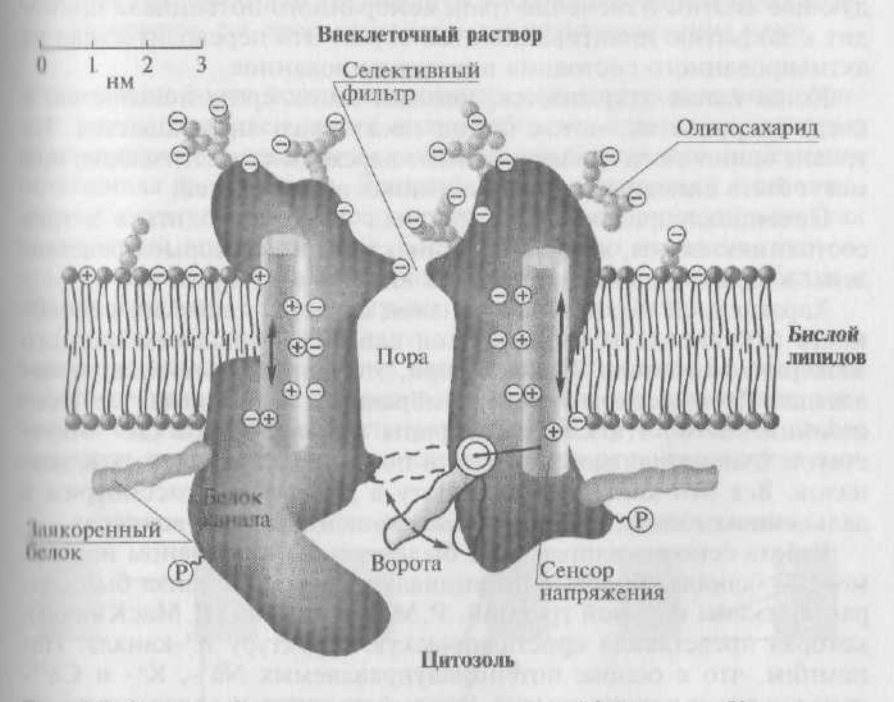


Рис. 4.5. Схема работы потенциалуправляемого Na^{+}-канала. Канал представлен как трансмембранная макромолекула с отверстием, проходящим насквозь через центр. Функциональные области ионного канала — селективный фильтр, ворота и сенсор напряжения — определены на основе электрофизиологических экспериментов

ность открытия и закрытия ворот канала контролируется сенсором напряжения. В случае потенциалуправляемых каналов сенсор должен включать много заряженных групп, которые двигаются электрическим полем. Необходимо заметить, что работа сенсора напряжения и ворот канала, показанная на рис. 4.5, представляла собой рабочую гипотезу Б. Хилле, высказанную на основании электрофизиологического изучения проводимости канала.

Рассматривая канал с позиций наличия только двух — активационных и инактивационных — ворот, можно представить следующую последовательность событий. В ответ на деполяризацию мембраны происходят изменения конформации канальной молекулы: одновременно начинают смещаться активационные и инактивационные ворота, но с разной скоростью и в разных направлениях: активационные ворота стремятся открыть, а инактивационные — закрыть канал. Скорость смещения частиц, образующих активационные ворота, больше, и это переводит канал из состояния покоя в открытое состояние — состояние активации. В этом состоянии через канал проходят ионы (например, натрия). Следующее за этим изменение трансмембранного потенциала приводит к закрытию инактивационных ворот. Это переводит канал из активированного состояния в инактивированное.

Когда канал открывается, ионный поток сразу появляется, а когда закрывается, поток ионов также сразу прекращается. На уровне одиночного канала воротные переходы стохастические; они могут быть описаны только в терминах вероятностей.

Потенциалуправляемый Na^+-канал может находиться в трех состояниях: покоя, активации и инактивации, которые представлены в виде модели на рис. 4.6 и в виде схемы на рис. 4.7.

Характерной чертой Ca^{2+}-каналов является также их способность активироваться только под влиянием трансмембранного электрического поля. Иначе говоря, эти каналы потенциалуправляемые. При высоком уровне мембранного потенциала, т. е. в состоянии покоя, эти каналы закрыты и поток ионов Ca^{2+} отсутствует. Сходной является работа и потенциалуправляемых K^+-каналов. Все эти каналы и их работу в деталях мы рассмотрим в дальнейших главах, специально посвященных этим вопросам.

Работа сенсора напряжения была изучена в основном на примере K^+-канала. Впервые потенциалуправляемый канал был охарактеризован научной группой Р. Мак-Киннона (R. MacKinnon), которая представила кристаллическую структуру K^+-канала. Напомним, что в основе потенциалуправляемых Na^+-, K^+- и Ca^{2+}-каналов лежат четыре домена, каждый из которых содержит шесть трансмембранных сегментов. Полагают, что в настоящее время первые четыре (S1—S4) функционируют как сенсор напряжения, а последние два (S5—S6) формируют проводящую пору. В области сенсора напряжения сегмент S4 имеет последовательность из

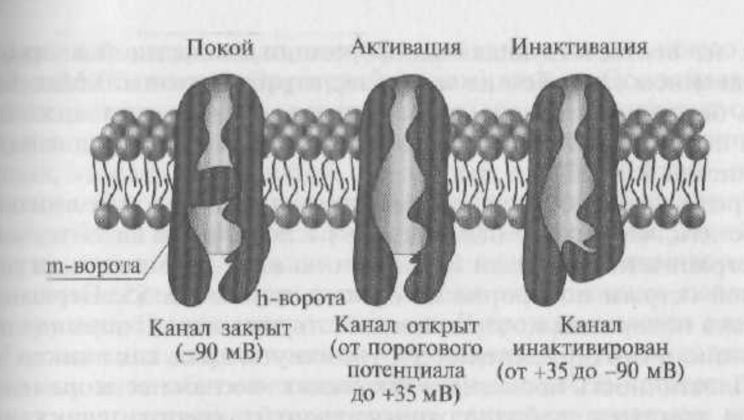


Рис. 4.6. Модель работы потенциалуправляемого Na^+-канала, имеющего активационные, или m-ворота, и инактивационные, или h-ворота. В состоянии покоя канал закрыт вследствие закрытия активационных ворот. Смещение мембранного потенциала в положительную область (до порогового потенциала) вызывает открытие активационных ворот. При достижении максимального для конкретной клетки потенциала канал инактивируется, т.е. происходит закрытие инактивационных ворот

четырех или более остатков аргинина или остатков лизина, причем каждый отделен двумя гидрофобными остатками, которые перемещаются в электрическом поле мембраны при изменении потенциала на мембране. Движение этих заряженных аминокислотных остатков было зарегистрировано экспериментально (так называемый воротный ток). Более того, было показано, что открытие одного канала сопровождается движением части белка с общим зарядом 13 элементарных зарядов (e_0).

До недавнего времени данные как о местоположении, так и характере движения воротных зарядов отсутствовали. Пионерская работа группы Р. Мак-Киннона представила первую кристаллическую структуру потенциалуправляемых K_VAP-каналов от *archea Aeropirum pernix*, хотя теперь известно, что это искаженная мо-

Рис. 4.7. Упрощенная схема работы потенциалуправляемого Na^+-канала, имеющего активационные, или m-ворота, и инактивационные, или h-ворота

дель, не соответствующая конформации, найденной в природном двойном слое. Тем не менее после работ группы Р. Мак-Киннона была представлена оригинальная «модель весла», которая была построена на основе идеи о погруженных в липид сегменте S2 и петли S1—S2.

Предложенная кристаллическая структура (рис. 4.8) позволяла допустить, что сенсор напряжения располагается на N-терминали, ограниченной петлей S3, и/или на их С-терминали, ограниченной острым поворотом на остатке глицина в S5. Первые несколько поворотов, которые соответствуют части С-терминали из традиционного определения S4, упомянуты здесь как линкер S4—S5. Пластичность последнего позволяет «веслам» сенсора напряжения двигаться свободно относительно белкового «тела» канала, расположенного внутри мембраны.

В исходном и наиболее известном варианте, основанном на результатах рентгеноструктурного анализа, модель K_VAP демонстрирует ожидаемую пору — ядро калиевого канала, состоящую из трансмембранных сегментов S5 и S6, окруженную сегментами S1—S3. Неожиданным результатом было то, что сегмент S4, представляющий собой спираль, наряду со второй частью сегмента S3 формирует α-спиральный «тонкий» элемент, который выходит из белковой структуры канала внутрь клеточной мембраны (см. рис. 4.8).

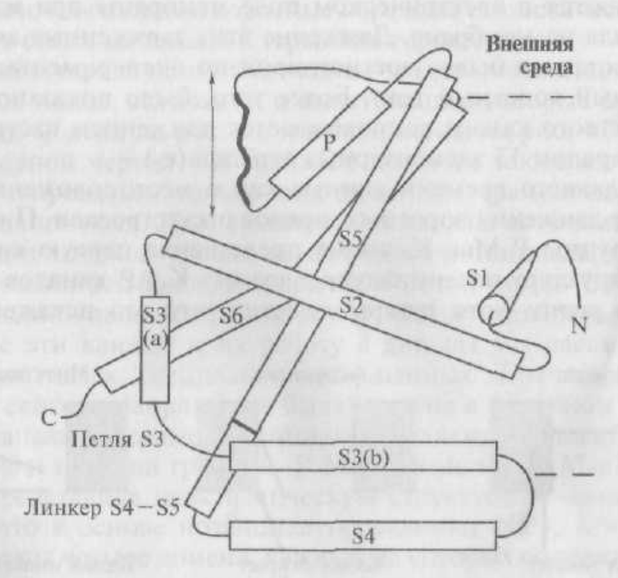


Рис. 4.8. Схематическое представление о топологии домена K_VAP-канала демонстрирует селективный фильтр, выделенный жирной волнистой линией, а стрелка показывает путь иона. Установленная граница между линкером S4—S5 и сегментом S5 обозначена разделительной линией

Далее авторы показали, что эта часть канала имеет гибкую связь с основной белковой структурой (телом) канала. Основываясь на подвижности этой части канала (весло), была предложена следующая гипотеза механизма потенциалчувствительности каналов. Во-первых, «весло» гидрофобно. Во-вторых, гидрофобность «весла» предполагает, что оно находится вне белкового окружения основного белка канала, т. е. в липидном слое мембраны. Это объяснило старую загадку — каким образом маленькие липидорастворимые молекулы так или иначе имеют возможность подхода к сенсору напряжения ионного канала. В-третьих, «весло» подвижно, но чисто с энергетической точки зрения (будучи гидрофобным) оно не «любит» покидать липидный слой. В-четвертых, это заряженная частица, которая может двигаться локально, внутри мембраны, перенося, таким образом, четыре положительных заряда от одной поверхности мембраны до другой (рис. 4.9).

Эта структура давала возможность понять, как «весла» сенсора напряжения могли бы двигаться в ответ на изменения потенциала в мембране, приводя к открытию поры. В кристаллической структуре они расположены около внутриклеточной стороны канала, однако электрофизиологические данные показали, что заряженные аминокислотные остатки «весла» все-таки могут покидать клеточную мембрану в сторону внеклеточной среды. Эти данные привели к созданию альтернативной модели, в которой заряженные сенсоры напряжения хотя и двигаются поперек мембраны, но

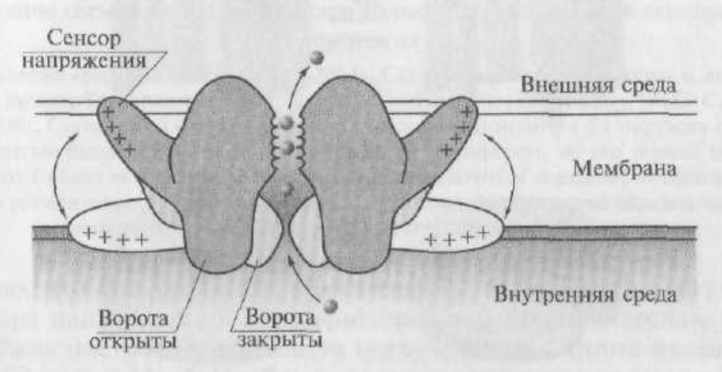


Рис. 4.9. Сенсоры напряжения в бактериальном калиевом канале — заряженные «весла», движение которых осуществляется через жидкую мембрану в сторону внутриклеточной среды. Четыре сенсора напряжения (два из которых показаны на рисунке) связаны механически с воротами канала. Каждый сенсор напряжения имеет четыре привязанных положительных заряда (аргининовые аминокислоты). Высокая чувствительность ворот канала к потенциалу объясняется фактом, что открытие канала сопровождается перемещением в общей сложности 16 зарядов поперек мембраны (Р. Мак-Киннон и соавт., 2004)

перемещаются в пределах белковой структуры канала, огражденной от липида мембраны другими частями белка (например, S1—S3), как изображено на рис. 4.10, *а*. Модель «весла» давала другую картину, представленную на рис. 4.10, *б*.

Применение метода электронного парамагнитного резонанса позволило расширить знания о структуре K_VAP-канала в его открытом и закрытом состоянии в реальном билипидном слое. В этой работе были использованы мутантные каналы, причем каждый из них имел остаток цистеина, встроенный в регион сенсора напряжения. Результаты экспериментов показали, что при функционировании канала части его белка:

1) подвижны;
2) выходят в липидный слой мембраны;
3) выходят также из липидного слоя во внеклеточную среду.

Первым приемлемым объяснением полученным результатам было предположение, что линкеры между трансмембранными сегментами были очень мобильны и способны выходить во внеклеточную среду — в частности, это применимо к петле S1—S2 (рис. 4.11). Эта гипотеза подтверждает классическое представление об организации трансмембранных сегментов, но она несовместима с кристаллической структурой всего K_VAP-канала. Не удиви-

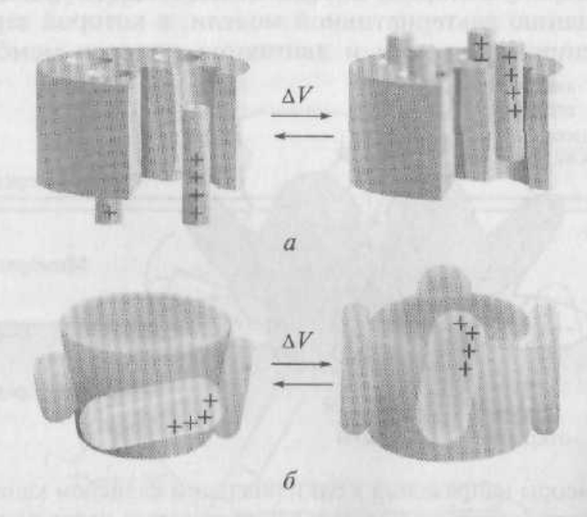


Рис. 4.10. Гипотеза воротного движения зарядов:

а — обычная модель voltage-dependent gating устанавливает, что воротные заряды перемещаются через ядро белка трансляцией и/или вращением-ротацией спиралей S4, которые двигаются независимо от других белковых сегментов в пределах ворот поры; *б* — в модели «весла», воротные заряды (написанный плюс) можно было бы переносить через мембрану от внутренней поверхности (низ) до внешней поверхности (верх) движением «весел» сенсора напряжения внутри липидного слоя мембраны, что, в свою очередь, могло открыть пору

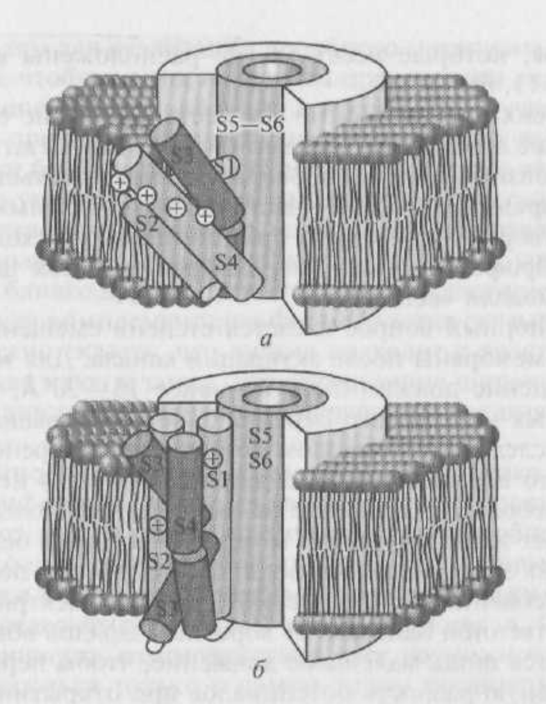


Рис. 4.11. Схематические представления оригинальной модели «весла» и топологической модели в открыто-инактивированном состоянии. Внутриклеточная часть расположена внизу, а внеклеточная часть — сверху. Показаны сегменты S. Представлен только один из четырех сенсоров напряжения:

а — модель «весла» (Y. Jiang et al., 2003). Сегменты S1 и S2 вложены в двойной слой, заряды S4 обращены в бислой; *б* — топологическая модель (K. G. Cuello et al., 2004). Сегменты S1 и S2 являются трансмембранными, а S1 окружен остальной частью белка. Сегмент S4 расположен на периферии, но его заряды направлены от бислоя и в центр белка с более внеклеточным зарядом, экспонированным в регион перехода бислоя липида. Поскольку большинство зарядов прикрыто сегментом S4, показаны только первый и четвертый заряды

тельно, что она также несовместима с предложенной структурой сенсора напряжения в виде оригинальной модели «весла», которая была построена, используя погруженные в липид петли S2 и S1—S2 (рис. 4.11, *а*). Необходимо также отметить, что модель «весла» значительно изменилась по сравнению с ее исходным вариантом, и сейчас, например, предполагают, что сегменты S1 и S2 являются трансмембранными.

Основные заключения последних исследований являются следующими:

1) сегменты S1—S4 являются спиральными трансмембранными сегментами;

2) петли не защищены от водной среды;

3) заряды, которые несет S4, не расположены в липидном слое (рис. 4.11, *б*).

Хотя до сих пор непонятно ни местоположение сегмента S4, ни положение его заряженных аминокислотных остатков, результаты исследований дают неопровержимое доказательство того, что воротные заряды сегмента S4 частично «выставлены» во внеклеточный раствор. Этот результат принципиально расходится с концепцией гидрофобного катиона, которая является центральным пунктом в модели «весла».

Другой спорный вопрос касается степени смещения сегмента S4 поперек мембраны после активации канала. Для модели «весла» перемещение должно быть не менее 15—20 Å, тогда как в традиционных моделях это перемещение не превышает 5 Å. Результаты исследований методом резонансного переноса энергии показали, что вертикальное смещение сегмента S4 не превышает 2 Å. Столь небольшое движение не соответствует модели «весла» и поддерживает альтернативную модель, в который белок формирует профиль электрического поля, фокусируя его поперек узкого региона сегмента S4. Мощное, но локальное электрическое поле в непосредственной близости от воротных зарядов объясняет, почему требуется лишь маленькое движение, чтобы перенести 13 e_0 через локальную разность потенциалов при открытии канала.

4.4. Лигандуправляемые ионные каналы

4.4.1. Общие представления о лигандрецепторном взаимодействии

Поскольку настоящая книга рассчитана на аудиторию с разными базовыми знаниями, мы прежде всего введем основные понятия, которые применяются при обсуждении вопросов лигандрецепторного взаимодействия.

Определенные молекулы, называемые *лигандами*, могут связываться со специфическими участками белков, встроенных в мембрану клетки. Это взаимодействие лежит в основе реализации множества функций как самих белков, так и клеток в целом. Лиганд представляет собой ту или иную молекулу, которая связывается со специфическим участком белка, называемым участком связывания, с помощью либо электрического притяжения между противоположно заряженными ионными или полярными группами лиганда и белка, либо слабого притяжения, обусловленного ван-дер-ваальсовыми силами между неполярными областями двух молекул. В таком связывании не участвуют ковалентные связи. Белок может содержать несколько участков связывания, каждый из которых специфичен в отношении определенного лиганда.

Вместе с тем для реализации подобного механизма связывания необходимо, чтобы лиганд находился практически рядом с участком связывания белка, поскольку в противном случае сила электрического притяжения между противоположно заряженными областями на белке и лиганде будет мала и, кроме того, эта сила значительно уменьшается по мере увеличения расстояния между белком и лигандом. Например, слабые ван-дер-ваальсовы силы действуют только между неполярными группами, которые находятся очень близко друг к другу. Эта близость достигается тем, что форма лиганда комплементарна форме участка связывания белка. Образно можно сказать, что лиганд подходит к участку связывания белка, как ключ к замку. Это определение широко известно и не является авторским, однако его первоисточник выявить не удалось.

Связывание лиганда с участком связывания белка может быть строго специфичным, и, следовательно, участок связывания может связывать только один тип лиганда. Эта способность участка связывания белка связывать только строго специфические лиганды называется *химической специфичностью*, поскольку участок связывания определяет(ся) тип(ом) химической связи. Столь высокая специфичность взаимодействия дает возможность белковой молекуле связаться только с одним типом соединения, игнорируя другие типы, находящиеся в среде. Молекулы белков с различными аминокислотными последовательностями имеют различную форму, и, следовательно, участки связывания также имеют различную форму и свою собственную химическую специфичность.

Хотя некоторые участки связывания имеют химическую специфичность, которая позволяет им связывать только один тип лиганда, другие участки являются менее специфичными и, таким образом, способны связывать ряд родственных лигандов, поскольку фрагмент каждого такого лиганда может быть комплементарен форме участка связывания. По этому принципу можно выделить участки связывания с высоким, промежуточным и низким сродством к лиганду.

Сила связывания лиганда с участком связывания белка известна как его *аффинность*, или сродство. Аффинность участка связывания для лиганда определяет, насколько вероятным является то, что связанный лиганд покинет поверхность белка и вернется в несвязанное состояние. Участок связывания, который прочно связывает лиганд, называется *участком связывания с высоким сродством* (высокоаффинным участком связывания — high-affinity binding site), а тот участок, с которым лиганд связывается слабо, называется *участком связывания с низким сродством* (низкоаффинным участком связывания — low-affinity binding site). Кроме этого, известны *участки связывания с промежуточной аффинностью* (intermediate-affinity binding site).

Аффинность и химическая специфичность являются двумя основными свойствами участков связывания. Химическая специфичность зависит только от формы участка связывания, а аффинность — от силы притяжения между белком и лигандом. Таким образом, различные белки могут быть способными связывать один и тот же лиганд, т.е. могут иметь одинаковую химическую специфичность, но сродство для этого лиганда может быть различным. Кроме того, чем ближе поверхность лиганда и участка связывания, тем сильнее притяжение. Следовательно, чем более форма лиганда соответствует форме участка связывания, тем больше аффинность связывания.

Между лигандами, находящимися в растворе, и соответствующими участками связывания белка быстро достигается равновесие, так что в любой момент некоторые свободные лиганды становятся связанными со свободными участками связывания, а некоторые связанные лиганды освобождаются от участков связывания. Единичный участок связывания либо содержит, либо не содержит связанный лиганд. Для описания этой ситуации применяют понятие *«насыщение»* (*сатурация*), которое определяет совокупность участков связывания, содержащих связанный лиганд в данный момент времени. Когда заполнены все участки связывания, говорят о 100 % насыщении. Когда лиганд связан с половиной имеющихся участков связывания, система насыщена на 50 % и т.д. Единичный участок связывания также будет насыщен на 50 %, если он содержит связанный лиганд в течение 50 % времени.

Процент насыщения участков связывания зависит и от концентрации свободного лиганда в растворе, и от аффинности участка связывания к лиганду.

Чем выше концентрация лиганда в растворе, тем больше вероятность, что молекула лиганда столкнется со свободным участком связывания и свяжется с ним. Таким образом, процент насыщения участков связывания будет нарастать с увеличением концентрации лиганда до тех пор, пока все участки не будут заполнены. Поскольку лиганд, связываясь с белком, вызывает биологический эффект, степень выраженности эффекта также будет нарастать с увеличением количества занятых лигандом участков связывания до тех пор, пока все они не будут заполнены. Дальнейшее увеличение концентрации лиганда не приведет ни к какому результату, поскольку все участки связывания будут заняты.

Вторым фактором, определяющим процент насыщения участков связывания, является аффинность участка связывания к лиганду. Обычные столкновения между молекулами, находящимися в растворе, и белком, содержащим связанный лиганд, могут привести к вытеснению непрочно связанного лиганда. Если участок связывания имеет высокую аффинность к лиганду, даже низкие

концентрации лиганда будут приводить к высокой степени его насыщения, поскольку уже связанный лиганд трудно вытеснить из участка связывания. Для достижения той же степени насыщения участка с низкой аффинностью требуется более высокая концентрация лиганда. Мерой сродства участка связывания к лиганду является концентрация лиганда, необходимая для обеспечения 50 % насыщения; чем более низкая концентрация лиганда необходима для связывания его с половиной центров связывания, тем больше аффинность участка связывания к лиганду.

В ряде случаев с определенными участками связывания может связываться более чем один тип лиганда, при этом имеет место конкуренция между лигандами за один и тот же участок связывания. Например, если в растворе присутствуют два конкурирующих лиганда — А и Б, то увеличение концентрации лиганда А будет приводить к увеличению количества связанного лиганда А, уменьшая таким образом количество участков, доступных для лиганда Б, и снижая количество связанного лиганда Б. В результате конкуренции биологические эффекты одного лиганда могут быть уменьшены в присутствии другого лиганда. Например, многие лекарства обеспечивают свое действие путем конкуренции за участки связывания с эндогенными лигандами организма. Занимая связывающий участок, лекарство уменьшает количество природного лиганда, который может быть связан с этим центром.

Лиганды могут быть агонистами или антагонистами.

Агонист — это лиганд, который связывается с участком связывания и изменяет состояние белковой молекулы — рецептора, заканчивающееся биологическим ответом. Например, в химическом синапсе агонистами называются вещества, действующие подобно трансмиттеру.

Обычные (традиционные) агонисты (conventional agonists) усиливают активность рецептора, тогда как обратные агонисты (inverse agonists) уменьшают эту активность. Активность рецептора может быть определена посредством пропорции рецептора в активной конформации (например, R* по сравнению с R), посттрансляционными модификациями (по мере продвижения секреторной гранулы к периферии клетки или у нейронов к их терминалям происходит так называемая посттрансляционная модификация, при которой соединения несколько меняются, например путем фосфорилирования) или некоторыми другими механизмами на уровне субклеточных мишеней.

Экзогенные агонисты могут действовать посредством связывания с тем же самым с участком связывания, как эндогенные агонисты (primary — основной или orthosteric — ортостерический участок связывания), или реже с другим регионом макромолекулы рецептора (аллостерический или аллотопический, участок связывания). Агонисты этой второй категории иногда упоминаются

как аллостерические (аллотопические) активаторы или аллостерические (аллотопические) агонисты.

Некоторые агонисты (например, глутамат) могут быть эффективными только в присутствии другого лиганда (например, глицина в случае глутамата), который связывается с другим участком связывания на макромолекуле рецептора. В этих условиях глутамат представляет собой первичный агонист, а глицин выступает как ко-агонист.

Наряду с агонистами имеются химические соединения, которые хотя и связываются с молекулой рецептора, но не могут открыть ионный канал. Занимая участок связывания, они препятствуют рецепции естественного трансмиттера и возникновению его эффекта, поскольку действуют на ту же самую макромолекулу рецептора, что и агонист. Такие вещества называют *антагонистами*, т.е. соединениями, которые предотвращают действие другого вещества — агониста.

Антагонизм может быть химическим или функциональным. Химический антагонизм — это результат наличия в среде антагониста и способности участка связывания белка связываться с ним. Функциональный антагонизм происходит на участках клетки, не имеющих отношения к рецептору, опосредующему ответ агониста.

Функциональный антагонизм может осуществляться с помощью разных механизмов в виде непрямого и физиологического антагонизма. Непрямой антагонизм представляет собой конкуренцию антагониста и агониста за место связывания с лигандом в промежуточной макромолекуле, которая участвует в осуществлении агонистом его биологической реакции. Связывание этого участка на промежуточной молекуле с антагонистом не дает возможности осуществиться этой реакции. Физиологический антагонизм — действие одного агониста обычно через другой рецептор — оказывает противоположный эффект по отношению к эффекту, характерному для оригинального агониста.

Поскольку белки вовлечены практически во все процессы, которые происходят в клетке, механизмы, контролирующие эти функции, сконцентрированы на регуляции активности белков. Известны два способа регуляции активности белков:

1) посредством изменения конформации молекулы белка, что влияет на связывание лиганда;

2) через регуляцию синтеза и деградации белков, что определяет типы белков и их количество в клетке.

В контексте настоящего материала представляется важным коротко обсудить первый тип регуляции — контроль за конформацией молекулы белка.

Поскольку конформация белков зависит от электрического притяжения между заряженными или поляризованными группа-

ми в различных областях белка, изменение в распределении заряда вдоль полипептидной цепи или полярности молекул, непосредственно окружающих его, будет изменять конформацию белка. Известны два механизма, используемых клетками для селективного изменения конформации определенных белков: это аллостерическая (рис. 4.12, *а*) и ковалентная (рис. 4.12, *б*) модуляции.

Сначала обсудим аллостерическую модуляцию (см. рис. 4.12, *а*). Сам термин «аллостерический» означает связанный с другим местом или связанный с другим центром. Рассмотрим это подробнее. При связывании лиганда с белком силы, притягивающие лиганд к белку, изменяют его конформацию. Например, когда лиганд приближается к участку связывания, эти силы могут вызвать изменение формы поверхности участка связывания и придавать ту форму, которая наиболее соответствует форме поверхности лиганда. Более того, изменение формы участка связывания приводит к изменению формы других областей белка. Таким образом, если белок содержит два участка связывания. Нековалентное связывание лиганда с одним из участков может изменить форму второго участка связывания и, таким образом, характеристики связывания этого, второго, участка. Это явление названо *аллостерической модуляцией*, а такие белки известны как *аллостерические*.

Один участок связывания аллостерического белка, названный *активным центром* (функциональным центром), связывается со своим лигандом и обеспечивает физиологическую активность белка. Однако для этого необходимо, чтобы предварительно другой уча-

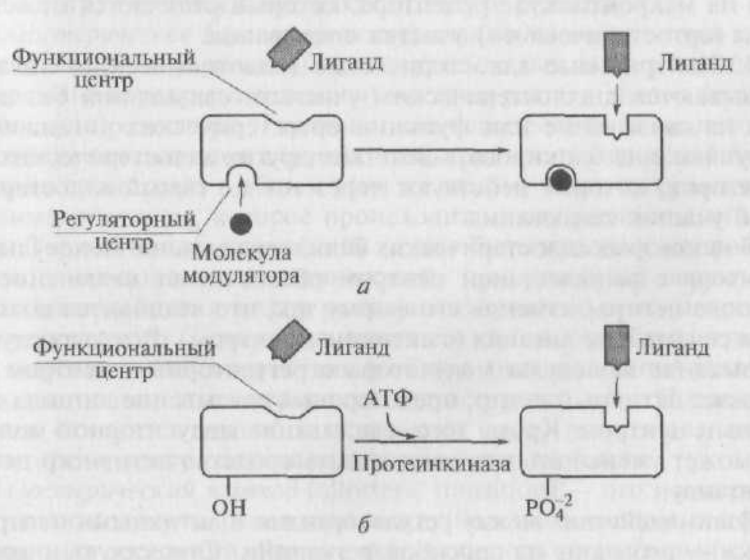


Рис. 4.12. Модуляция:
а — аллостерическая; *б* — ковалентная

сток связывания, названный регуляторным центром, связался со своим лигандом и изменил форму активного центра. Лиганд, который связывается с регуляторным участком, называется *модуляторной молекулой*, поскольку его связывание с регуляторным центром аллостерически модулирует форму белковой молекулы и, таким образом, активность активного центра.

Таким образом, модуляторная молекула или, иначе, аллостерический (аллотопический) модулятор представляет собой лиганд, который увеличивает или уменьшает действие основного (или ортостерического) агониста или антагониста, соединяясь с другим (аллостерическим, или аллотопическим) местом на рецепторной макромолекуле, т.е. с регуляторным центром.

Среди аллостерических (аллотопических) модуляторов выделяют несколько видов.

1. Аллостерические (аллотопические) усилители (allosteric enhancers) — модуляторы, которые усиливают аффинность ортостерических лигандов и/или эффективность агониста, не создавая никакого собственного эффекта.

2. Аллостерические (аллотопические) антагонисты — это модуляторы, которые уменьшают аффинность ортостерических лигандов и/или эффективность агонистов.

3. Аллостерические (аллотопические) агонисты, или аллостерические (аллотопические) активаторы — это лиганды, которые являются способными опосредовать активацию рецептора их собственным путем посредством связывания с центром распознавания на макромолекуле рецептора, который отличается от основного (ортостерического) участка связывания.

4. Нейтральные аллостерические (аллотопические) лиганды связываются с аллостерическим участком связывания без влияния на связывание или функции ортостерических лигандов, но могут все еще блокировать действие других аллостерических модуляторов, которые действуют через тот же самый аллостерический участок связывания.

В некоторых аллостерических белках связывание молекулы модулятора с регуляторным центром обеспечивает включение активного центра, изменяя его форму так, что становится возможным связывание лиганда (с активным центром). В других случаях связывание молекулы модулятора с регуляторным центром выключает активный центр, предотвращая связывание лиганда с активным центром. Кроме того, связывание модуляторной молекулы может уменьшать или увеличивать сродство активного центра к лиганду.

Взаимодействие между регуляторными и активными центрами белка — это один из способов регуляции. Существует и другой способ регуляции, при котором активные центры определенных белков могут влиять друг на друга. Обычно эти белки состоят бо-

лее чем из одной полипептидной цепи, которые соединены вместе благодаря электрическому притяжению между отдельными цепями. При этом на каждой цепи может быть только один связывающий участок, который является активным центром, однако связывание лиганда с активным центром одной из цепей может приводить к изменению активных центров, расположенных на других цепях. Это происходит благодаря тому, что изменение формы цепи, связавшей лиганд, индуцирует изменение формы другой цепи. Явление взаимодействия между активными центрами в мультимерном белке (т.е. в белке, содержащем более чем одну полипептидную цепь) известно как кооперативность. Кооперативность может обеспечивать прогрессивное увеличение аффинности для связываемого лиганда по мере того, как все большее количество участков белка связывают лиганд.

Синтопическое взаимодействие (syntopic interaction) — это взаимодействие между лигандами, которые связываются с тем же самым центром распознавания или с местами распознавания, которые перекрываются на рецепторной макромолекуле. Этот термин чаще всего применяют при описании конкурентоспособных взаимодействий между лигандами, которые связываются с основным (ортостерическим) участком связывания на рецепторе, но применение данного термина не ограничено этой определенной ситуацией. Синтопическое взаимодействие возможно также между различными лигандами, которые совместно используют одинаковый центр распознавания (например, общий аллостерический центр) где-нибудь на макромолекуле рецептора.

Аллостерическое (*аллотопическое*) *взаимодействие* — это взаимодействие между лигандами, которые связываются с отличающимися (не перекрывающимися) местами распознавания на макромолекуле рецептора. Термины «синтопический» и «аллотопический» рекомендуются для того, чтобы различать взаимодействия, которые происходят в общем (том же самом) месте по сравнению с взаимодействием, которое происходит между различными местами. Термин «аллотопический» может быть использован равноценно с термином «аллостерический» при описании перекрестного взаимодействия между различными участками на макромолекуле рецептора. Термин «синтопический» должен быть ограничен, определяя взаимодействия в общем (том же самом) месте, и не должен заменяться термином «ортостерический». Последний термин относится только к основному месту распознавания на рецепторе — месту связывания эндогенного агониста.

Аллостерический переход (allosteric transition) — это изомеризация макромолекулы рецептора между большим числом конформационных состояний. Разные авторы использовали термин «аллостерический» в различных ситуациях. Первое общее использование термина должно описать любой механизм, который вклю-

чает изомеризацию рецептора между двумя или более конформационными состояниями, каждое из которых может отображать различную аффинность к данному лиганду. Второе общее использование термина должно описывать взаимодействие между двумя топографически отличающимися местами распознавания на макромолекуле рецептора в данном конформационном состоянии. Чтобы применять оба варианта использования терминов, рекомендуется, чтобы термин «аллостерический переход» использовался при описании механизмов изомеризации рецептора. Термин «аллостерическое (аллотопическое) взаимодействие» необходимо использовать при описании перекрестного взаимодействия между лигандами, связывающимися с неперекрывающимися местами распознавания на макромолекуле рецептора.

Ковалентная модуляция — это второй способ изменить форму и, таким образом, активность белка (см. рис. 4.12, *б*). Она заключается в ковалентном присоединении заряженных химических групп к некоторым боковым остаткам аминокислот полипептидной цепи. В русскоязычной литературе это явление обычно называется *ковалентной модификации.*

В большинстве случаев к белку благодаря реакции фосфорилирования ковалентно прикрепляется фосфатная группа, несущая отрицательный заряд. В этом случае фосфатная группа переносится с одной молекулы на другую. Фосфорилирование одного из боковых остатков определенной аминокислоты в белке приводит к появлению в этой области отрицательного заряда. Этот заряд изменяет распределение электрических сил в белке и обеспечивает изменение его конформации. Если изменение конформации влияет на участок связывания, это приводит к изменению свойств этого участка. Хотя этот механизм значительно отличается от описанного ранее, эффекты, производимые ковалентной модуляцией, подобны эффектам, обеспечиваемым аллостерической модуляцией, т. е. при ковалентной модуляции функциональный участок связывания может быть включен или выключен или может быть изменена его аффинность для лиганда. Напомним, что в отличие от аллостерической модуляции, которая обеспечивается нековалентным связыванием модуляторной молекулы, ковалентная модуляция требует химической реакции, в которой образуется ковалентная связь.

4.4.2. Общие представления о лигандуправляемых ионных каналах

Лигандуправляемые ионные каналы совмещены с рецептором для того или иного фармакохимического соединения. Лигандуправляемый ионный канал может находиться в двух состояниях:

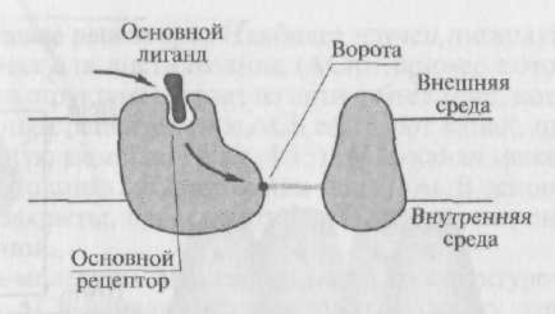


Рис. 4.13. Ионотропный рецептор

открытом или закрытом. При связывании рецептора ионного канала с лигандом обратимо меняется конформация ионного канала, и он открывается.

Разрушение или отсоединение лиганда ведет к закрытию ионного канала.

Один из вариантов классификации лигандуправляемых ионных каналов заключается в том, что подобные каналы могут быть двух типов. Если в результате взаимодействия рецептора и лиганда сразу открывается ионный канал, то подобные рецепторы называют *ионотропными* (рис. 4.13).

Рецепторы, в которых открытие ионного канала связано с подключением еще других химических процессов, называют *метаботропными* (рис. 4.14). На метаботропных рецепторах лиганд открывает ионный канал не прямо, а опосредованно через вторичные мессенджеры.

Поскольку в задачу настоящего издания не входит детальное обсуждение лигандуправляемых каналов, здесь и далее ограничимся лишь общей информацией по этому вопросу.

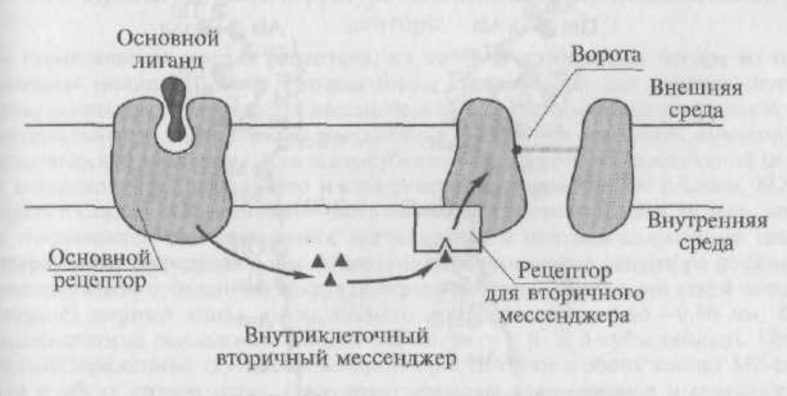


Рис. 4.14. Метаботропный рецептор

Пора

α β δ α γ

9 нм

6 нм

δ α β α

Центр связывания трансмиттера

Мембрана клетки

Внеклеточная жидкость

3 нм

Цитозоль

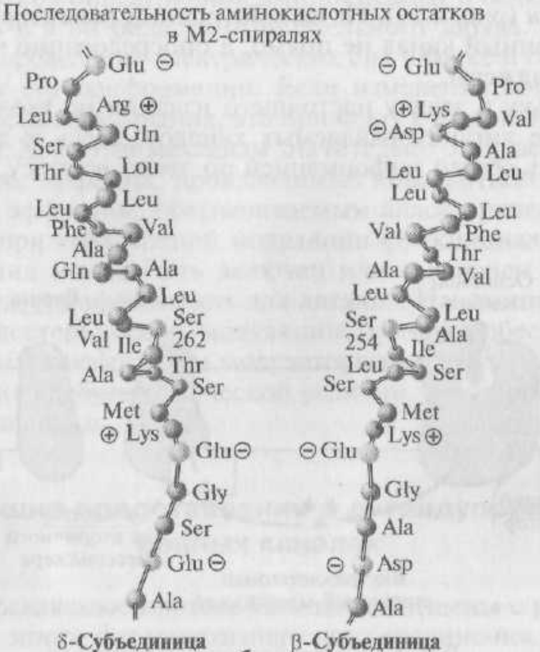
2 нм

Ворота

М2-Спираль

2 нм

а



б

Ионотропные рецепторы. Наиболее изучен лигандуправляемый ионный канал для ацетилхолина (ACh), пример которого и рассмотрим. Эта структура состоит из пяти субъединиц, которые вместе с ионотропным рецептором к ACh образуют канал, пронизывающий клеточную мембрану (рис. 4.15). ACh-канал может находиться *в двух состояниях: открытом или закрытом. В основном* каналы этого типа закрыты, однако в открытом состоянии они проницаемы для ионов.

Если две молекулы ACh связываются со структурой лигандуправляемого ACh-канала, это приводит к сдвигу заряда внутри макромолекулы и вследствие этого к изменению ее конформации. Центральная часть канала расширяется, а его внутренний диаметр становится приблизительно равным 0,65 нм. Благодаря этому центральный канал становится проходимым для одновалентных *катионов.*

Однако для анионов канал не проходим из-за отрицательных зарядов на внутренних стенках. Таким образом, ACh-канал представляет собой неспецифический ионный канал с проводимостью для одновалентных катионов. Если проводимость для ионов натрия и калия одинакова у данного типа холинорецептора, то типы ионных токов, которые проходят через открытые каналы, будут определяться электрохимическими градиентами для данных катионов.

Поскольку равновесный потенциал для ионов Na^+ *равен* +55 *мВ*, а потенциал мембраны клетки лежит в диапазоне от –60 до –80 мВ, существует сильная движущая сила для ионов Na^+, и они устремляются внутрь клетки, деполяризуя ее мембрану. Однако канал проницаем и для ионов K^+, для которых сохраняется незначи-

---

Рис. 4.15. Прогнозируемая структура никотинового ацетилхолинового рецептора:

а — схематическая модель рецептора, на которой изображены четыре из пяти различных полипептидов и которая имеет состав $\alpha_2\beta\gamma\delta$; для ясности формы γ-субъединица не показана. Эта модель основана на данных аминокислотной последовательности. Большинство массы белка выходит за внешнюю поверхность *плазматической мембраны. Каждая α-субъединица содержит связывающий центр* для ацетилхолина; большинство массы рецептора составлено из β-слоев. M2-α-спираль в каждой субъединице — часть облицовки ионного канала. Ворота, которые открываются при связывании ацетилхолина с центром связывания трансмиттера, лежат в пределах поры. Модель поперечного среза рецептора показывает расположение субъединиц вокруг центральный поры. В ее самой узкой части (в мембране) ионный канал имеет диаметр приблизительно 0,65–0,80 нм; *б* — аминокислотные последовательности M2-спирали в β- и δ-субъединицах. *Отрицательно заряженные глутамат и аспартат присутствуют в обоих концах M2-спиралей* с обеих сторон поры. Они предотвращают вход анионов и содействуют связыванию Na^+- и K^+-ионов в канале

тельный электрохимический градиент, направленный из внутриклеточной области к внеклеточной среде. Так как равновесный потенциал ионов K^+ равен примерно –90 мВ, через мембрану одновременно проходят и ионы K^+, слегка противодействуя тем самым деполяризации, обусловленной входящим током ионов Na^+. Работа описанных каналов ведет к базовому входящему току положительных ионов, и, следовательно, к деполяризации мембраны. Применительно к синаптическому потенциалу начинает развиваться фаза нарастания возбуждающего постсинаптического потенциала.

Так как открывшиеся под действием медиатора каналы холинорецептора быстро закрываются, то текущие по этим каналам ионные токи быстро прекращаются, а спад возбуждающего постсинаптического потенциала обусловлен главным образом пассивным разрядом емкости мембраны, т.е. пассивным током утечки, возвращающим сдвинувшийся (деполяризационный) потенциал к исходному уровню потенциала покоя. Ионные токи, участвующие в возникновении такого рода потенциалов, ведут себя иначе, нежели токи ионов Na^+ и K^+ через потенциалуправляемые каналы. Причина заключается в том, что проводимость лигандуправляемых каналов зависит только от количества молекул лиганда, связавшихся с молекулами рецептора, в результате чего и открываются эти каналы, а амплитуда потенциала, следовательно, зависит от числа открытых ионных каналов. Так, амплитуда возбуждающего постсинаптического потенциала лежит примерно в диапазоне от 100 мкВ до 10 мВ.

Итак, специфическая молекула лиганда связывается с белком, образующим канал, и открывает этот канал для ионов. Для этого на белке имеется связывающий участок, однако он не является абсолютно специфичным. Для большинства рецепторов установлен целый ряд эндогенных и экзогенных соединений, способных к взаимодействию с участком связывания. В качестве примера рассмотрим так называемый никотиновый холинорецептор. Его естественным лигандом является ACh. Однако с ACh-рецептором могут связываться сходные по структуре химические соединения, например сукцинилхолин, который имитирует действие ACh, что приводит к генерации деполяризующего постсинаптического потенциала. Некоторые значительно отличающиеся по химическому строению молекулы, например никотин, могут также соединяться с участком связывания рецепторного белка. Вещества, действие которых подобно действию трансмиттеров, называются агонистами. Часто такие соединения используются для идентификации рецептора. Так, например, произошло с никотином, что породило название никотиновый ACh-рецептор или nACh-рецептор.

Наряду с агонистами имеются химические соединения, которые хотя и связываются с молекулой рецептора, но не могут от-

крывать ионный канал. Занимая участок связывания, они препятствуют взаимодействию с естественным трансмиттером и возникновению физиологического эффекта. В результате эти соединения блокируют ионный канал, препятствуя его открытию. Такие вещества называют антогонистами. Например, содержащийся в яде кураре d-тубокурарин является конукрентным блокатором для никотиновых рецепторов. Он конкурирует с природным трансмиттером, связываясь с ACh-рецептором нервно-мышечного синапса, и препятствует произвольным сокращениям мышц, что в результате остановки дыхания приводит к смерти.

Другим соединением, которое высоко специфично, конкурентно и необратимо связывается с никотиновыми ACh-рецепторами, является змеиный яд α-бунгаротоксин. Он действует уже в наномолярной концентрации и может применяться в экспериментах для того, чтобы маркировать ACh-рецепторы на поверхности клетки.

Метаботропные рецепторы. На метаботропных рецепторах лиганд открывает ионный канал не прямо, а опосредованно через вторичные мессенджеры.

Примером метаботропного рецептора может служить Ach-рецептор мускаринного типа или mACh-рецептор. Этот рецептор приобрел свое название благодаря действию агониста, яда мухомора — мускарина. Ионные каналы, необходимые для возникновения потенциала, открываются там только благодаря процессам метаболизма, поэтому эти рецепторы называют метаботропными. Процесс проиллюстрирован на рис. 4.16. Мускариновый или mACh-рецептор связан с G-белком. Гетеротримерный G-белок состоит из трех субъединиц: α, β и γ. Как только ACh связывается с рецептором, наблюдается активация G-белка. Активация большинства G-белков приводит к их конформационному изменению. Неактивные G-белки существуют главным образом в форме αβγ-гетеротримеров, с ГДФ, находящихся в тех позициях, которые связывают нуклеотид.

Взаимодействие гетеротримерных G-белков с присоединившим лиганд рецептором ведет к преобразованию α-субъединицы в активную форму, которая имеет повышенное сродство к ГТФ и пониженную аффинность его к βγ-комплексу. В результате активированная α-субъединица освобождает ГДФ, присоединяет ГТФ, а затем диссоциирует от βγ-димера. У многих G-белков диссоциированная α-субъединица затем взаимодействует с эффекторными белками. Однако у ряда G-белков, например, в сердце, как это показано на рисунке, освободившийся βγ-димер может быть ответственным за все эффекты лигандрецепторного взаимодействия.

Необходимо отметить, что связывание ацетилхолина с мускариновыми M_2-рецепторами сердца приводит к активации особого класса K^+-каналов. В данном случае связывание ацетилхолина с

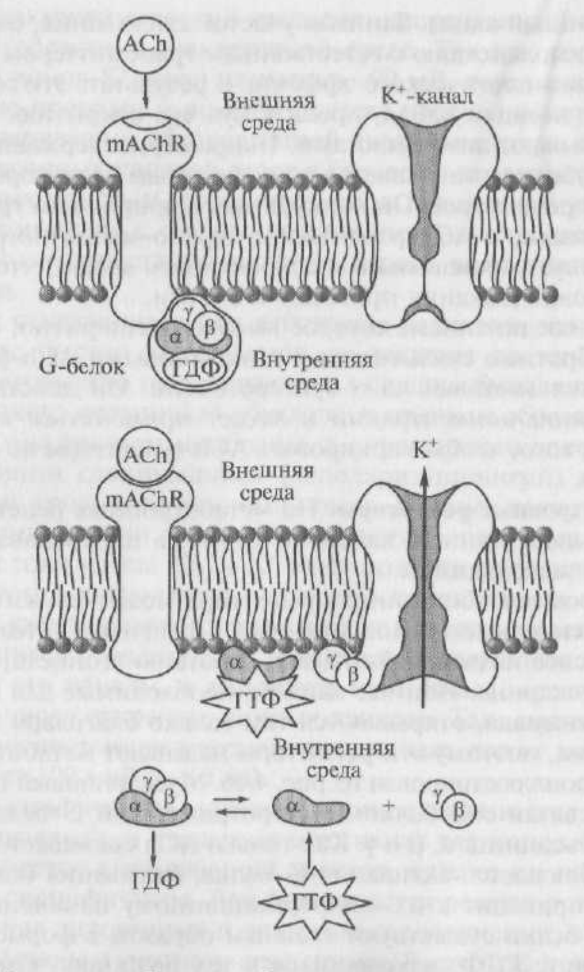


Рис. 4.16. Механизм работы метаботропного рецептора на примере мускаринового ацетилхолинового рецептора

мускариновым рецептором ведет к активации G_i-белка. Его активированная α_i-субъединица затем отделяется от $\beta\gamma$-димера, а $\beta\gamma$-димер напрямую взаимодействует с этим особым классом K^+-каналов, повышая вероятность их открытого состояния. Например, связывание ацетилхолина с мускариновыми рецепторами, повышающее K^+-проводимость пейсмейкерных клеток в синоатриальном узле сердца — это один из главных механизмов, посредством которого парасимпатические нервы вызывают замедление частоты сердечных сокращений.

У вторичных мессенджеров имеется много возможностей для осуществления влияния на ионные каналы. С помощью различных

вторичных мессенджеров определенные ионные каналы могут открываться или закрываться. Наряду с описанным механизмом открытия канала с помощью активированной β- и γ-субъединиц G-белка, как это имеет место в клетках сердца, у многих клеток других тканей при помощи ГТФ может также активироваться α-субъединица.

Для мускариновых рецепторов имеются конкурентные блокаторы. У мускариновых синапсов это, например, атропин — алкалоид, содержащийся в растениях семейства пасленовых. Известны и соединения, которые сами блокируют ионный канал. Эти соединения не конкурируют за места связывания и являются так называемыми неконкурентными блокаторами. Применительно к синапсам известно, что бактериальные токсины на уровне синаптического аппарата осуществляют специфическое воздействие на систему G-белка. Так, холеротоксин препятствует гидролизу α-G_s-ГТФ в α-G_s-ГДФ и повышает тем самым активность аденилатциклазы. Пертуситоксин препятствует связыванию ГТФ с α-G_i-субъединицей G-белка и блокирует ингибирующий эффект α-G_i. Такое опосредованное действие повышает в цитозоле концентрацию цАМФ.

На других метаботропных рецепторах другие вторичные мессенждеры могут участвовать в реализации эффекта. Так, ионные каналы могут открываться при помощи цАМФ/IP_3 или при помощи фосфорилирования протеинкиназы С. Этот процесс исходит от G-белка, который активирует фосфолипазу С, что в свою очередь ведет к образованию IP_3. Дополнительно увеличивается образование диацилглицерола (DAG) и протеинкиназы. Механизм действия вторичных мессенджеров будет подробнее описан в следующих главах.

4.4.3. Токи через лигандуправляемые ионные каналы

На примере двух различных типов лигандуправляемых ионных каналов (одиночного ионного канала, связанного с ACh-рецептором, и одиночного K^+-канала, активируемого ACh) продемонстрируем условия, приводящие к их открытию, и токи, текущие через них.

Для описания первого типа лигандуправляемых ионных каналов в качестве примера приведем никотиновый ацетилхолиновый рецептор, который сам является ионным каналом. На рис. 4.17, *а* показана регистрация тока в конфигурации outside-out patch, протекающего через одиночный ионный канал бычьего nACh-рецептора, экспрессированного в ооцит ксенопуса. Этот лигандуправляемый канал состоит из нескольких субъединиц. В первом случае

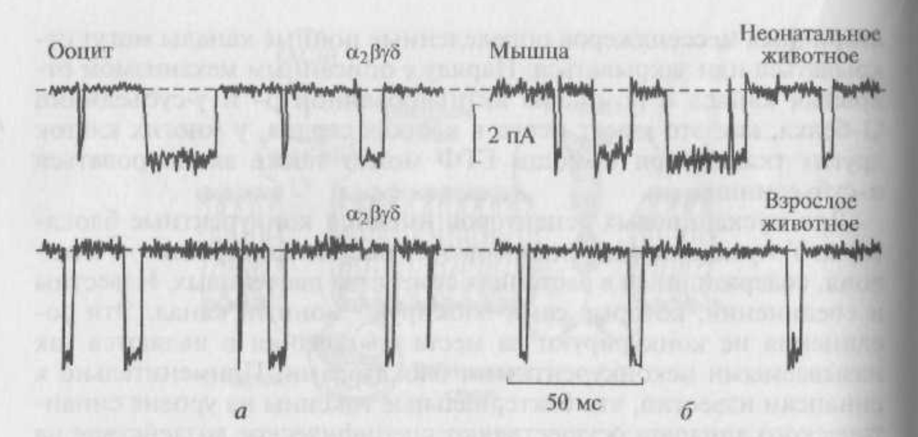


Рис. 4.17. Регистрация тока, протекающего через одиночный ионный канал бычьего nACh-рецептора, экспрессированного:

а — в ооцит ксенопуса; *б* — в мембрану клетки эмбриональных и взрослых мышц

(вверху) канал имеет конфигурацию $\alpha_2\beta\gamma\delta$, во втором случае (снизу) — конфигурацию $\alpha_2\beta\varepsilon\delta$. В обоих случаях одиночный ток возникает при стимуляции канала ACh в концентрации 500 нмоль/л. На рис. 4.17, *б* показана реакция nACh-рецептора эмбриональной

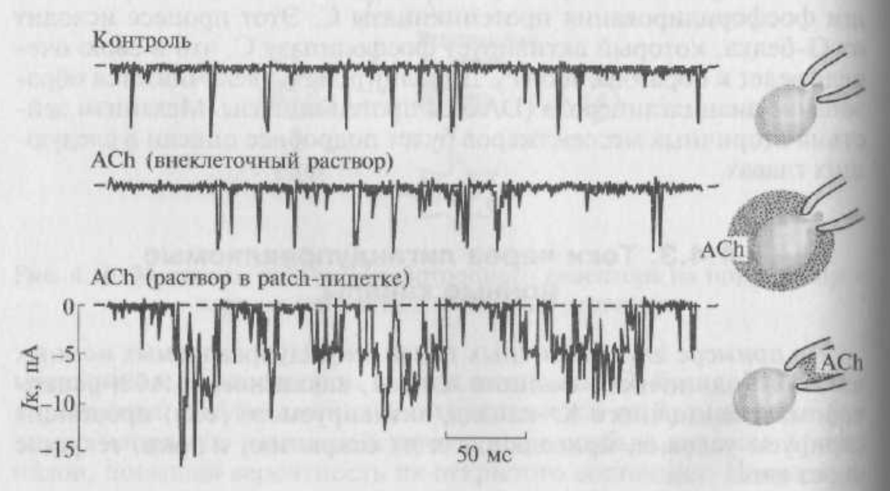


Рис. 4.18. Регистрация входящего K^+-тока, протекающего через K^+-канал, активируемый ACh, — K(ACh)-канал, в cell-attached конфигурации. Верхняя кривая демонстрирует контрольную регистрацию, средняя кривая показывает регистрацию на фоне введенного в перфузионный раствор ACh в концентрации 100 нмоль/л. Нижняя кривая демонстрирует регистрацию на фоне введенного в patch-пипетку ACh в концентрации 10 нмоль/л

и взрослой мышц на приложение ACh. В обоих случаях реакции возникают только на аппликацию ACh.

В качестве второго типа лигандуправляемого ионного канала рассмотрим K^+-ионный канал, активируемый ACh. На рис. 4.18 показана регистрация входящего K^+-тока, активируемого ACh. Такой канал иначе пишется как K(ACh)-канал. Контрольная регистрация демонстрирует определенную активность канала. На фоне введенного в перфузионный раствор ACh в концентрации 100 нмоль/л вероятность открытия канала не меняется, поскольку он находится под patch-пипеткой и ACh не может проникнуть в эту область.

Нижняя кривая демонстрирует регистрацию на фоне введенного в patch-пипетку ACh в концентрации 10 нмоль/л. В этом случае наблюдается выраженная активация канала, поскольку соединение контактирует с его рецептором.

4.5. Механоуправляемые ионные каналы

4.5.1. Общие представления о механосенситивности и механосенситивном ионном канале

Механоуправляемый, или механосенситивный, ионный канал — это канал, у которого изменение проводимости является ответом на механическую деформацию мембраны. Механическая энергия передается на канал либо за счет изменения натяжения липидного бислоя, либо через цитоскелет клетки. Выделяют каналы, активируемые и инактивируемые растяжением клетки. Также, по-видимому, обнаружены каналы, реагирующие на сжатие клетки.

Вопросы, связанные с механоуправляемыми ионными каналами, мы рассматриваем достаточно детально, поскольку информацию по этой новейшей проблеме можно найти только в зарубежных научных и учебных изданиях.

В этой связи необходимо очертить определенные терминологические проблемы, связанные с механоуправляемыми каналами. Этот тип каналов является, по существу, частным случаем рецепторуправляемого, а именно механоуправляемым ионным каналом.

В действительности так бы и следовало называть эти каналы. Однако исторически сложилось, что во всей имеющейся литературе механоуправляемый ионный канал называется механосенситивным (МСК) (в зарубежной литературе — mechanosensitive channel: MSC или MSCs).

Механосенситивность представляет собой универсальное свойство практически всех клеток. Однако принцип передачи и преоб-

разования механического натяжения в ответную реакцию клетки до сих пор не ясен. Преобразование механического сигнала в клетке, по-видимому, должно реализовываться:

1) через цитоскелет и его механохимические компоненты, такие как актин и тубулин;

2) клеточные поверхностные протеины, такие как интегрины;

3) механосенситивные ионные каналы.

Из всех перечисленных структур, обеспечивающих механическую передачу в клетке, МСК наиболее просты в изучении, поскольку они быстро отвечают на механическое воздействие и этот ответ легко обнаружить. Наиболее важная информация относительно свойств МСК вначале была получена не от специальных механосенситивных клеток, а при изучении клеток, чья основная функция не связана с механочувствительностью. Это объясняется тем, что передача механического натяжения в клетке тесно связана со структурными компонентами мембраны, натяжение которой они чувствуют, а получить изолированные клетки с неповрежденной мембраной было достаточно сложно.

Механосенситивные каналы отвечают на механический стресс мембраны изменением вероятности открытия канала. Они существуют в волосковых клетках, механорецепторах, мышечных веретенах, сосудистом эндотелии и нейросенсорной ткани, где их физиологическая функция достаточно понятна. Однако менее понятно, почему электроневозбудимые клетки, такие как клетки крови и эпителиальные клетки, нуждаются в каналах, которые отвечают на механические стимулы. По-видимому, это связано с тем, что все клетки должны сталкиваться с проблемой регуляции объема и электролитного гомеостаза. Регуляция клеточного роста также требует специфической механопередающей системы, которая определяет физические изменения клеточных размеров и формы. Таким образом, нельзя исключить, что нерегулируемый рост, характерный для раковых клеток, связан с поломкой такой механопередающей системы.

Определение канала как механосенситивного — эмпирическое — означает изменение вероятности открытия канала в ответ на механическую деформацию мембраны. Механочувствительность определяется каналами, активирующимися при растяжении клетки — stretch-activated channels (SAC) или инактивирующимися при растяжении клетки — stretch-inactivated channels (SIC). Некоторые МСК, по-видимому, включаются, когда сила ориентирована по направлению к ядру клетки. Это свойство найдено у глиальных, гладкомышечных и эндотелиальных клеток. Ряд каналов активируются в ответ на локальное приложение давления — pressure activated channels (PAC).

Предполагают наличие и pressure inactivated channels (PIC), которые закрываются в ответ на локальное приложение давления.

Такие разные принципы механической чувствительности предполагают, что не все МСК принадлежат к единой гомологичной семье каналов. Определено, что изменение их проницаемости происходит в ответ на натяжение (tension) мембраны, которое «чувствует» канал или окружающие его липиды или связанный с ним цитоскелет мембраны.

Вместе с тем необходимо отметить, что в 2007 г. факт наличия SIC был подвергнут сомнению, поскольку ряд авторов показали, что SIC могут представлять собой SAC, которые находятся в состоянии pre-stretch (B. Suchyna and F. Sachs, 2007; A. Kamkin et al., 2007). Что же касается PAC, то согласно закону Лапласа позитивное или негативное давление вносит одинаковый вклад в механический стресс. Канал активируется tension, а не направлением кривой (A. Kamkin et al., 2007).

4.5.2. Механосенситивный канал

У МСК изменение проводимости является ответом на деформацию мембраны клетки. Прежде всего необходимо обсудить, что подразумевается под этим ответом. В настоящее время постулируется, что МСК — это ионный канал, который «узнает» механическую деформацию и воспринимает ее как полноценный физиологический сигнал. Модель МСК представлена на рис. 4.19.

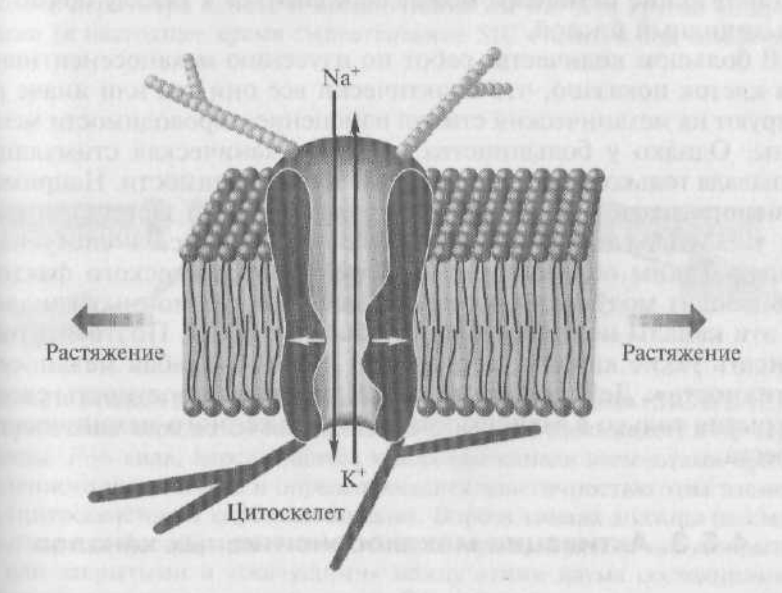


Рис. 4.19. Модель механосенситивного ионного канала в окружении мембраны клетки

Несмотря на значительное различие в ионной селективности и чувствительности к механическому воздействию, есть большое число свойств, общих для различных классов МСК. Всегда, когда мы говорим об изменении поведения МСК, необходимо иметь в виду, что канал может быть только в двух состояниях: открытом или закрытом. Так, у всех изучаемых SAC механические стимулы вызывают увеличение вероятности открытия канала. Механический стимул не вызывает изменений проводимости и ионной селективности единичного канала. Отсутствие изменений в селективности и проводимости в условиях механического воздействия на клетку подтверждает представление о том, что именно растяжение мембраны открывает каналы.

В основе активации каналов растяжением лежит мембранный или мембранно-цитоскелетный механизм. По-видимому, растяжение не вовлекает цитозольные вторичные мессенджеры. Принципиальные доказательства этого следуют из данных о том, что МСК могут регистрироваться при растяжении фрагмента мембраны, вырезанной по специальной методике из клетки. Тем не менее, с одной стороны, различное количество нитей цитоскелета остается даже в вырезанном фрагменте реальной клеточной мембраны. Через эти нити цитоскелета на канал может передаваться растяжение и, следовательно, увеличивается вероятность открытия МСК. С другой стороны, встраивание МСК, обнаруженных у бактерий, в искусственные липосомы демонстрирует, что натяжение мембраны может передаваться к каналу прямо через липидный бислой.

В большом количестве работ по изучению механосенситивности клеток показано, что практически все они так или иначе реагируют на механический стимул изменением проводимости мембраны. Однако у большинства клеток механическая стимуляция вызывала только небольшие изменения проводимости. Например, незначительные изменения проводимости были зарегистрированы у НМДА-канала, который будет обсуждаться в следующих главах. Таким образом, под действием механического фактора происходит модуляция проницаемости многих ионных каналов, но эти каналы не имеют ничего общего с МСК. Поэтому чтобы описать такие каналы, используют термин «слабая механосенситивность». Действительно, МСК меняют вероятность своего открытия только в зависимости от приложенного механического стресса.

4.5.3. Активация механосенситивных каналов

Главное свойство МСК заключается в том, что его пространственная организация меняется в течение процесса перехода от

Рис. 4.20. Модель воротного механизма для SIC и SAC. В каждом случае больший диаметр конформации канального белка должен быть более устойчивым с увеличением натяжения мембраны в плоскости. Проводимость уже открытого канала не изменяется с увеличением натяжения. Обе эти конформации возникают с некоторой вероятностью при всех значениях натяжения мембраны. Натяжение мембраны определяет растяжение периметра канала и предпочтение им той или другой конформации (в настоящее время существование SIC ставится под сомнение)

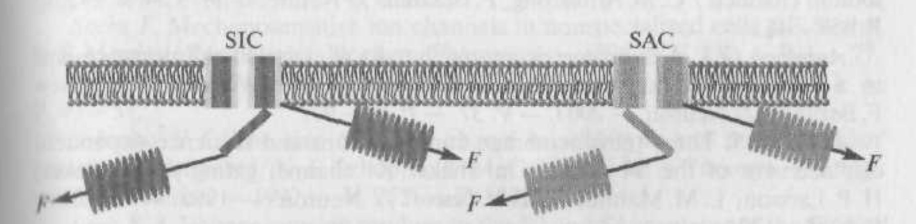


Рис. 4.21. Модель двух типов механосенситивного канала (SIC и SAC), в которых сила передается на ворота канала через цитоскелет, а не через липиды. F — сила, передающаяся к воротам канала элементами присоединенного цитоскелета и определяющаяся эластичностью этих элементов (цитоскелетом и воротами канала). Ворота канала должны рассматриваться как бистабильные элементы, которые являются или открытыми или закрытыми и «скачущими» между этими двумя состояниями с вероятностью, определяемой силой F (в настоящее время существование SIC ставится под сомнение)

закрытого к открытому состоянию. Если вероятность открытого состояния канала больше, чем закрытого, то это канал SAC, а если наоборот — SIC. При приложении определенной силы у SAC открытое состояние предпочтительнее, чем закрытое, как более энергетически низкое.

У эукариотов силы, по-видимому, передаются к каналам как посредством цитоскелета, так и при помощи липидов мембраны. Функциональный эквивалент модели на рис. 4.20 демонстрируется на рис. 4.21 с дополнением в виде цитоскелета. Хотя на рис. 4.21 представлен канал, который растягивают в одном направлении, в действительности он может быть растянут в нескольких направлениях из-за распределения сил на реальной клеточной мембране.

В последний год появились данные о молекулярной организации МСК, но они не могут быть включены в данное издание. Поэтому МСК определены по фенотипическому принципу на основе того, как они отвечают на то или иное механическое воздействие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Камкин А.Г. Механоэлектрическая обратная связь в сердце / А.Г.Камкин, И.Н.Ярыгин, И.С.Киселева. — М. : Натюрморт, 2003.

Фундаментальная и клиническая физиология / под ред. А.Г.Камкина, А.А.Каменского. — М. : Изд. центр «Академия», 2004.

Aggarwal S.K. Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K^+ channel / S.K.Aggarwal, R. MacKinnon // Neuron. — 1996. — V. 16. — P. 1169—1177.

Armstrong C.M. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels / C.M.Armstrong, F.Bezanilla // Nature. — 1973. — V. 242. — P. 459—461.

Asamoah O.K. A fluorometric approach to local electric field measurements in a voltage-gated ion channel / O.K.Asamoah, J.P.Wuskell, L.M.Loew F.Bezanilla // Neuron. — 2003. — V. 37. — P. 85—97.

Baker O.S. Three transmembrane conformations and sequence-dependent displacement of the S4 domain in Shaker K^+ channel gating / O.S.Baker, H.P.Larsson, L.M.Mannuzzu, E.Y.Isacoff // Neuron. — 1998. — V. 20. — P. 1283—1294.

Bezanilla F. The voltage-sensor structure in a voltage-gated channel // TRENDS in Biochemical Sciences. — 2005. — V. 30(4). — P. 166 — 168.

Bezanilla F. Voltage sensor movements // J. Gen. Physiol. — 2002. — V. 120. — P. 465—473.

Catteral W.A. Structure and function of voltage-sensitive ion channels // Science. — 1988. — V. 242. — P. 50 — 61.

Cuello L.G. Molecular architecture of the KvAP voltage dependent K^+ channel in a lipid bilayer / L.G.Cuello, D.M.Cortes, E.Perozo // Science.— 2004. — V. 306. — P. 491—495.

Doyle D.A. The structure of the potassium channel: molecular basis of KC conduction and selectivity // D.A. Doyle, J. Morais Cabral, R.A. Pfuetzner et al. // Science. — 1998. — V. 280. — P. 69—77.

Gandhi C.S. Molecular models of voltage sensing / C.S. Gandhi, E.Y. Isacoff // J. Gen. Physiol. — 2002. — V. 120. — P. 455—463.

Hille B. Ionic channels of excitable membranes / B. Hille. — Sunderland, Mass : Sinauer Associates, 1992.

Horn R. Coupled movements in voltage-gated ion channels // J. Gen. Physiol. — 2002. — V. 120. — P. 449—453.

Jiang Y. X-ray structure of a voltage-dependent K^+ channel / Y. Jiang, A. Lee, J. Chen et al. // Nature. — 2003. — V. 423. — P. 33—41.

Jiang Y. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K^+ channel / Y. Jiang, V. Ruta, J. Chen et al. // Nature. — 2003. — V. 423. — P. 42—48.

Kamkin A. Mechanosensitivity of cells from various tissues / A. Kamkin, I. Kiseleva // Mechanosensitivity in Cells and Tissues / ed. by A. Kamkin, I. Kiseleva. — M. : Academia Publishing House Ltd., 2005. — P. 1 — 21 (Editorial).

Larsson H.P. Transmembrane movement of the Shaker K^+ channel S4 / H.P. Larsson, O.S. Baker, D.S. Dhillon, E.Y. Isacoff // Neuron. — 1996. — V. 16. — P. 387—397.

MacKinnon R. Voltage sensor meets the lipid membrane // Science.— 2004.— V. 306. — P. 1304—1305.

Molecular cell biology / ed. by H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk et al. — 3rd ed. — N.Y. : Freeman and Company, 1995.

Sachs F. Biophysics of mechanoreception // Membrane Biochemistry. — 1986. — V. 6(2). — P. 173 — 195.

Sachs F. Mechanical transduction by ion channels: how forces reach the channel // Soc. Gen. Physiol. Ser. — 1997. — V. 52. — P. 209 — 218.

Sachs F. Mechanical transduction by membrane ion channels: a mini review // Mol. Cell. Biochem. — 1991. — V. 104(1 — 2). — P. 57 — 60.

Sachs F. Mechanical transduction in biological systems // Crit. Rev. Biomed. Eng. — 1988. — V. 16. — P. 141 — 169.

Sachs F. Mechanosensitive ion channels in nonspecialized cells / F. Sachs, C.E. Morris // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. — 1998. — V. 132. — P. 1 — 77.

Sachs F. Stretch-sensitive ion channels // Neurosci. — 1990. — V. 2. — P. 49—57.

Schoppa N.E. The size of gating charge in wild-type and mutant shaker potassium channels // N.E. Schoppa, K. McCormack, M.A. Tanouye, F.J. Sigworth // Science. — 1992. — V. 255. — P. 1712—1715.

Seoh S.A. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K^+ channel / S.A. Seoh, D. Sigg, D.M. Papazian, F. Bezanilla // Neuron. — 1996. — V. 16. — P. 1159—1167.

Sigworth F.J. Voltage-gated ion channels control electrical activity in nerve, muscle and many other cell types. The crystal structure of a bacterial voltage-gated channel reveals the astonishingly simple design of its voltage sensor // Nature. — 2003. — V. 423. — P. 21 — 22.

Starace D.M. A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field / D.M. Starace, F. Bezanilla // Nature. — 2004. — V. 427. — P. 548—552.

Starace D.M. Histidine scanning mutagenesis of basic residues of the S4 segment of the Shaker K^+ channel / D.M. Starace, F. Bezanilla // J. Gen. Physiol. — 2001. — V. 117. — P. 469—490.

Swartz K.J. Mapping the receptor site for hanatoxin, a gating modifier of voltagedependent K^+ channels / K.J. Swartz, R. MacKinnon // Neuron. — 1997. — V. 18. — P. 675—682.

Yusaf S.P. Measurement of the movement of the S4 segment during the activation of a voltage-gated potassium channel // S.P. Yusaf, D. Wray, A. Sivaprasadarao // Europ. J. Physiol. — 1996. — V. 433. — P. 91—97.

ГЛАВА 5

ПАССИВНЫЙ ИОННЫЙ ТРАНСПОРТ ЧЕРЕЗ ИОННЫЕ КАНАЛЫ МЕМБРАНЫ

5.1. Размещение ионов относительно мембраны

Как отмечалось ранее, в растворе ионы перемещаются случайным образом в результате столкновений с молекулами растворителя. Средняя кинетическая энергия ионов, связанная со случайными тепловыми движениями, такова, что скорость, с которой отдельные виды ионов выходят из некоторого малого объема, пропорциональна градиенту их концентрации. Если концентрации данных ионов в разных местах неодинаковы, то ионы будут перемещаться из областей с высокой концентрацией в области с низкой.

Однако движению ионов в клетку или из нее препятствует мембрана. Поскольку мембрана представляет собой липидный бислой, не проницаемый для ионов, можно сказать, что она обладает сопротивлением. И наоборот, мембрана обладает некоторой проводимостью для ионов благодаря тому, что ионы проходят через ионные каналы.

Ионы различаются по величине, трехмерной конфигурации и слоям молекул воды (гидратационным оболочкам), которые связаны с ними (табл. 5.1). Проницаемость мембраны для тех или иных ионов определяется двумя факторами: числом имеющихся каналов и их типом (размерами, формой, химическими свойствами и связанными зарядами). Каналы каждого типа проявляют в отношении ионов избирательность, зависящую от величины и формы последних, а также от энергетических факторов (от того, насколько легко отделяются от иона его гидратационные слои). В результате каналы данного типа пропускают только некоторые сходные между собой ионы.

Поскольку мембрана препятствует перемещению ионов, снаружи и внутри клетки находятся одинаковые ионы, но в разных концентрациях (см. табл. 5.1). Примером тому является гигантский аксон кальмара, который в 1964—1966 гг. изучали А.Л. Ходжкин (A.L. Hodgkin) и Б. Катц (B. Katz).

Таблица 5.1. **Концентрации ионов в цитоплазме гигантского аксона и крови кальмара**

Ион	Концентрация, ммоль/л		Радиус иона в кристалле, Å	Гидратационное число
	цитоплазма	кровь		
K^+	400	20	1,33	2,9
Na^+	50	440	0,95	4,5
Cl^-	40—150	560	1,81	2,9
Ca^{2+}	0,4	10	0,99	7,0
Mg^{2+}	10	54	0,66	10,0

Основные ионы, на базе которых осуществляется механизм электрогенеза клетки, — K^+ и Na^+. Их распределение поддерживается механизмом активного транспорта Na^+ и K^+, или электрогенным Na^+/K^+-насосом, который удерживает внутри клетки концентрацию Na^+ на низком, а концентрацию K^+ на высоком уровне, транспортируя Na^+ из клетки наружу, а K^+ из наружной среды внутрь. В результате активности этого насоса внутри нервной клетки концентрация K^+ примерно в 20 раз выше, а концентрация Na^+ примерно в 10 раз ниже, чем в наружной среде. У гигантского аксона кальмара внутриклеточная концентрация K^+ равна 400 ммоль/л, а внеклеточная — 20 ммоль/л, внутриклеточная концентрация Na^+ равна 50 ммоль/л, а внеклеточная — 440 ммоль/л.

Существование мембранного потенциала связано с тем, что концентрация ионов K^+ по обе стороны мембраны различна и что в покое мембрана обладает относительно высокой проницаемостью *для ионов* K^+. *Механизм избирательной проницаемости* мембраны в покое для K^+ и Na^+ не известен. Перемещение этих ионов осуществляется по специальным ионным каналам — каналам утечки. По-видимому, ключевыми факторами являются число и специфические свойства каналов, открытых в состоянии покоя. Эти каналы, позволяющие проходить ионам K^+, пропускают также и ряд других катионов, но мало проницаемы для Na^+. В покое мембрана примерно в 100 раз более проницаема для K^+, чем для Na^+.

Многие годы оставалось неясным, что представляют собой каналы утечки, о существовании которых предположили в 1965 г. Только после недавних работ в области молекуляной биологии доказали не только само существование этих каналов, но и определили их структуру — димер, состоящий из четырех трансмембральных сегментов и двух петель. Поэтому каналы утечки получили название K_{2P}-наналы.

5.2. Ионное равновесие

5.2.1. Мембранный потенциал при простом ионном равновесии

Пусть в системе имеются только один проникающий через мембрану катион и один непроникающий анион. При простом ионном равновесии, формирующемся при разделении двух растворов с разной концентрацией избирательно проницаемой мембраной, будет достигнуто равновесие ионов и возникнет равновесная разность потенциала (потенциал Нернста—Доннана), который можно измерить с помощью милливольтметра, соединенного с растворами посредством электродов. Доннановское равновесие устанавливается между клеткой и окружающей средой, если клеточная мембрана хорошо проницаема для неорганических ионов, но непроницаема для белков и других крупных органических ионов.

Рассмотрим следующий пример. Пусть есть два раствора KCl с концентрацией 10 и 100 ммоль/л, разделенные проницаемой для катионов мембраной. Эта мембрана может иметь поры, вдоль которых расположены фиксированные отрицательные заряды. Если поры достаточно узкие и плотность фиксированных зарядов высока, через нее будут проникать только ионы калия, перемещаясь от одного отрицательно заряженного участка поры к другому, тогда как анионы хлора из-за электростатического отталкивания не смогут войти в поры (рис. 5.1).

Рис. 5.1. Сосуд, разделенный мембраной на две части с различными концентрациями ионов K^+. Разность потенциалов ($E_а - E_б$), равная −58 мВ, представляет собой равновесный потенциал через мембрану

В отсутствие внешней цепи, соединяющей растворы через систему электродов и металлических проводников, спустя некоторое время будет достигнуто ионное равновесие. Вода не будет находиться в равновесии, поскольку под действием осмотического давления переместится из разбавленного раствора в более концентрированный. Однако такое равновесие легко получить, если приложить соответствующее гидростатическое давление к концентрированному раствору или ввести в разбавленный раствор неэлектролит, для которого мембрана непроницаема, скомпенсировав тем самым осмотическое давление.

Механизм установления равновесия для ионов калия и хлора различен. Ионы хлора достигают равновесия за счет механических и электростатических сил, поскольку не проникают через мембрану. До тех пор пока в структуре мембраны не произойдет существенных изменений, суммарный поток ионов хлора и обменная диффузия, регистрируемая с помощью меченых частиц, будут отсутствовать. Установление же равновесия ионов калия является термодинамическим процессом и обусловлено взаимным уравновешиванием движущих сил в системе.

В процессе установления равновесия небольшое количество ионов калия проходит через мембрану, заряжая ее и приводя к появлению разности электрических потенциалов. Когда разность потенциалов «уравновешивает» градиент концентрации этих ионов, их дальнейшая направленная диффузия через мембрану прекращается.

Суммарный перенос ионов калия с одной стороны мембраны на другую в данном случае — не самопроизвольный процесс, в результате которого не может совершаться работа. Следовательно, парциальная моляльная свободная энергия — так называемый электрохимический потенциал ионов калия (максимальная работа, которую можно совершить при переносе одного моля ионов калия в некоторое условное стандартное состояние) — должна быть одинакова для обоих растворов. Выражение для электрохимического потенциала можно записать в виде

$$\mu = \mu_0 + RT \ln a + zF\varphi,$$

где μ_0 зависит только от природы растворителя и не зависит от концентрации иона и электрического потенциала; R — газовая постоянная, равная 8,314 Дж · г-моль · град$^{-1}$; T — абсолютная температура; a — активность, которую можно рассматривать как молярную концентрацию, если ввести поправку на наличие взаимодействия между ионами; z — валентность или число элементарных зарядов, приходящихся на один ион, с учетом знака заряда: для K^+ $z = +1$, для Cl^- $z = -1$, для Ca^{2+} $z = +2$ и т.д.; F — число Фарадея, равное 96 520 Кл · г-экв$^{-1}$; φ — электрический потенциал.

Разность потенциалов между двумя данными точками соответствует работе, которую совершает электрическое поле при перемещении единичного заряда из одной точки в другую. Для заряда в 1 Кл и разности потенциалов 1 В эта работа равна 1 Кл · В = 1 Дж. Присвоив индекс *i* величинам, соответствующим концентрированному раствору, а индекс *o* — величинам, относящимся к разбавленному раствору, запишем условие равновесия иона, валентность которого равна *z*:

$$\mu_{0o} + RT\ln a_o + zF\varphi_o = \mu_{0i} + RT\ln a_i + zF\varphi_i.$$

Поскольку для обоих растворов растворитель в виде воды один и тот же, $\mu_{0o} = \mu_{0i}$ и

$$\varphi_i - \varphi_o = \frac{RT}{nF}\ln\frac{a_o}{a_i} = 2{,}3\frac{RT}{nF}\lg\frac{a_o}{a_i}.$$

Если считать, что коэффициенты активности для обоих растворов одинаковы, выражение можно упростить:

$$\varphi_i - \varphi_o = 2{,}3\frac{RT}{nF}\lg\frac{C_o}{C_i}.$$

Равновесную разность потенциалов (потенциал Нернста—Доннана) можно измерить с помощью милливольтметра, соединенного с растворами электродами. Разность потенциалов между электродом и раствором в общем случае зависит от состава раствора. Чтобы прямо измерить разность электрических потенциалов между двумя растворами, необходимо использовать прибор, который не создает в цепи дополнительной разности потенциалов.

Рассмотренный пример равновесия представляет собой простейший частный случай равновесия Гиббса—Доннана, когда в системе есть только один проникающий через мембрану катион и один непроникающий анион.

Теперь перейдем к выводу формул, которые описывают этот тип равновесия в более общем случае.

5.2.2. Доннановское равновесие

Доннановское равновесие устанавливается между клеткой и окружающей средой, если клеточная мембрана хорошо проницаема для неорганических ионов, но непроницаема для белков и других крупных органических ионов.

В основе уравнений, описывающих распределение ионов в доннановской системе, лежит условие электронейтральности, т.е. равенство суммарной концентрации анионов, в основном Cl^- и от-

рицательно заряженных макромолекул A^-, а также катионов K^+ как внутри

$$[K^+]_{in} = [Cl^-]_{in} + n[A^-]_{in},$$

так и снаружи клетки

$$[K^+]_{out} = [Cl^-]_{out} + n[A^-]_{out},$$

где n — число отрицательных зарядов на каждой белковой молекуле.

Поскольку в межклеточной жидкости содержание катионов существенно выше, чем отрицательно заряженных макромолекул, их вкладом можно пренебречь и вместо предыдущего выражения написать

$$[K^+]_{out} = [Cl^-]_{out} = C_{out},$$

где C_{out} — молярная концентрация электролитов во внешней среде.

С другой стороны, между концентрацией проникающего иона и потенциалом существует соотношение, которое можно представить как

$$\frac{\left[K^+\right]_{in}}{\left[K^+\right]_{out}} = \frac{\left[Cl^-\right]_{out}}{\left[Cl^-\right]_{in}}.$$

Из этого следует условие доннановского равновесия:

$$[K^+]_{in}[Cl^-]_{in} = [K^+]_{out}[Cl^-]_{out}.$$

5.3. Роль пассивного ионного транспорта в формировании потенциала покоя

5.3.1. Поток ионов через мембрану

Основным механизмом пассивного транспорта веществ, обусловленным наличием концентрационного градиента, является диффузия через ионные каналы. Проникновение растворенных частиц, обладающих электрическим зарядом, через клеточную мембрану зависит и от электрического градиента мембраны. В этом случае при наличии противоположно направленного электрического градиента перенос ионов может осуществляться в направлении, противоположном их концентрационному градиенту. Совокупность концентрационного и электрического градиентов называется электрохимическим градиентом. На границе раздела двух жидких сред в результате различной подвижности ионов возникает диффузионный потенциал. Его частным видом можно считать

мембранный потенциал. Поскольку для каждого вида ионов концентрация по обе стороны мембраны неодинакова, можно рассчитать равновесный потенциал для каждого иона. Мембранный потенциал можно рассчитать на основе уравнения Гольдмана и измерить при помощи внутриклеточного микроэлектрода, соединенного со входом усилителя.

Таким образом, пассивный ионный транспорт через мембрану осуществляется по ионным каналам и определяется электрохимическим градиентом. Пассивный ионный транспорт лежит в основе потенциала покоя, пассивного электротонического потенциала, локального ответа и потенциала действия. Кроме того, пассивный ионный транспорт обеспечивает проведение потенциала действия по мембране. Рассмотрим упомянутые формы биоэлектрической активности, определяемые пассивным ионным транспортом.

В покое клетка поддерживает на своей поверхностной мембране разность потенциалов около 60—80 мВ, причем ее внутренняя сторона электроотрицательна по отношению к наружной.

Основным механизмом пассивного транспорта веществ, обусловленным наличием концентрационного градиента, является диффузия.

Как отмечалось, уравнение, связывающее поток и градиент концентрации, является математической записью первого закона Фика и имеет вид

$$\vec{j}_k = -D \operatorname{grad} \vec{C},$$

где постоянная D — коэффициент диффузии, $см^2 \cdot с^{-1}$.

Поскольку $D = RTu$, где R — газовая постоянная; T — абсолютная температура; u — подвижность ионов, уравнение, связывающее поток и градиент концентрации, можно представить как

$$\vec{j}_k = -RTu \operatorname{grad} \vec{C}.$$

Известно, что

$$\operatorname{grad} \vec{U} = \frac{\partial u}{dx}\vec{i} + \frac{\partial u}{dy}\vec{j} + \frac{\partial u}{dz}\vec{k},$$

где x, y, z — оси координат.

Если диффузионный поток ионов идет через мембрану только вдоль одной координаты, например вдоль оси x, то его градиент равен производной по x.

Тогда уравнение, связывающее поток и градиент концентрации, можно представить как

$$j_k = -RTu \frac{dC_k}{dx}, \tag{5.1}$$

где C_k — концентрация k сорта иона.

Проникновение растворенных частиц, обладающих электрическим зарядом, через клеточную мембрану зависит не только от концентрационного градиента, но и от электрического градиента мембраны. В связи с этим перенос ионов может осуществляться в направлении, противоположном концентрационному градиенту, при наличии противоположно направленного электрического градиента:

$$j_k = -z_k F u_k C_k \frac{d\varphi}{dx}, \tag{5.2}$$

где z_k — заряд k сорта иона; F — число Фарадея; u_k — подвижность k сорта иона; C_k — концентрация k сорта иона; φ — потенциал.

Как отмечалось, совокупность концентрационного (5.1) и электрического (5.2) градиентов называется электрохимическим градиентом. Тогда уравнение, связывающее поток и электрохимический градиент, можно представить как

$$j_k = -RTu \frac{dC_k}{dx} - z_k F u_k C_k \frac{d\varphi}{dx}.$$

Это известное уравнение Нернста—Планка. Первый член в правой части описывает только диффузию, второй — перемещение частиц в электрическом поле. Таким образом, дифференциальное уравнение Нернста—Планка можно рассматривать как аналитическое выражение законов Фика и Ома одновременно.

Пассивный транспорт ионов через ионные каналы мембраны всегда происходит по электрохимическому градиенту и обеспечивает любой тип изменения потенциала клетки и его проведение по волокну.

5.3.2. Диффузионный потенциал

В возникновении потенциалов клеток главную роль играют потенциалы, обусловленные несимметричным, т.е. неравномерным, распределением ионов относительно мембраны. Это диффузионные потенциалы.

Диффузионные потенциалы возникают на границе раздела двух жидких сред в результате различной подвижности ионов. Пусть имеется сосуд с раствором соляной кислоты, разделенный пористой перегородкой на две половины. В левой половине сосуда концентрация соляной кислоты выше, чем в правой. Тогда ионы водорода и хлора будут диффундировать из левой половины в правую по градиенту концентрации. Скорости диффузии ионов будут определяться их подвижностями. Подвижность иона водорода равна 315 $см^2 \cdot Ом^{-1} \cdot$ г-экв, а подвижность иона хлора — 65,5 $см^2 \cdot Ом^{-1} \cdot$ г-экв. В результате большей подвижности ионы водорода при диффузии

будут намного опережать ионы хлора. Так как ионы водорода имеют положительный заряд, а ионы хлора — отрицательный, то в правой половине сосуда возникнет положительный заряд, а в левой — отрицательный.

Диффузионная разность потенциалов приводит к торможению более «быстрых» ионов и ускорению более «медленных», поскольку *силы возникающего электрического поля направлены против сил* диффузии. Диффузионная разность потенциалов достигает максимального значения в тот момент, когда скорости диффузии ионов становятся равными. Диффузионную разность потенциалов E (мВ) находят из уравнения Гендерсона:

$$E = \frac{u - v}{u + v} \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_1}{a_2}, \qquad (5.3)$$

где u — подвижность катиона; v — подвижность аниона; R — газовая постоянная; T — абсолютная температура; n — валентность ионов; F — число Фарадея; a_1 — активность ионов в области, откуда идет диффузия; a_2 — активность ионов в области, куда идет диффузия.

Под активностью ионов понимают их активную концентрацию. Активность ионов всегда меньше их абсолютной концентрации, что обусловлено взаимодействием ионов друг с другом, а также с электрически заряженными группами других молекул. Активность *выражается произведением коэффициента активности f (для сильно* разбавленных растворов равен единице, а для обычных физиологических — 0,76), определяемого эмпирически, на абсолютную концентрацию C ионов:

$$a = fC.$$

*Как следует из уравнения (5.3), диффузионная разность потен*циалов зависит от разности в подвижностях катиона и аниона и отношения активностей ионов в измеряемых участках. Очевидно, что при одинаковой подвижности катиона и аниона, а также при отсутствии концентрационного градиента диффузионный потенциал будет равен нулю.

Частным случаем диффузионного потенциала можно считать мембранный потенциал. Допустим, пористую перегородку в сосуде, которая пропускала и катионы, и анионы, заменили избирательно проницаемой мембраной, пропускающей только катионы. Ею может быть мембрана с большой концентрацией фиксированных отрицательных зарядов — катионообменная. В таком случае подвижность ионов хлора в мембране равна нулю, и в правую часть сосуда диффундируют только ионы водорода. Диффузия ионов водорода не будет бесконечным процессом, поскольку они испытывают притяжение к оставшимся по другую сторону мембраны ионам хлора. После установления равновесия между силами диф-

фузии и силами электрического поля на мембране возникает двойной электрический слой, и диффузия ионов прекращается.

Если $v = 0$, то уравнение (5.3) превращается в уравнение Нернста, с помощью которого вычисляют мембранную разность потенциалов:

$$E = \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_1}{a_2}. \quad (5.4)$$

Как из него следует, мембранный потенциал зависит от температуры и величины концентрационного градиента диффундирующих через мембрану ионов.

Если перейти от натуральных логарифмов к десятичным и подставить в уравнение (5.4) значения постоянных *R* и *F*, то при 20 °С получим

$$E = 58 \frac{1}{n} \lg \frac{a_1}{a_2}.$$

Этим уравнением обычно пользуются для практических расчетов мембранного потенциала; оно показывает, что при изменении отношения активностей ионов в 10 раз потенциал изменяется на 58 мВ.

5.3.3. Равновесный потенциал ионов

У каждого вида ионов концентрации по обе стороны мембраны неодинаковы, поэтому можно рассчитать равновесный потенциал. Рассмотрим это понятие на примере ионов K^+. Поскольку в результате работы Na^+/K^+-насоса внутри клетки ионы K^+ присутствуют в большей концентрации, они стремятся посредством диффузии перейти в область более низкой концентрации, т.е. из клетки во внеклеточную среду по градиенту концентрации. Однако во внутриклеточной среде необходимо сохранить общую электронейтральность, т.е. равенство положительных и отрицательных зарядов, поэтому выход во внешнюю среду ионов K^+ должен быть скомпенсирован либо входом внутрь клетки ионов Na^+, либо выходом анионов. Однако внутриклеточные анионы велики. Это в основном отрицательно заряженные белки и аминокислоты. Поскольку мембрана в покое проницаема для Na^+ значительно меньше, чем для K^+, он должен выходить из клетки без сопровождения анионов по градиенту концентрации. В результате на внешней поверхности мембраны будет накапливаться положительный заряд, а на внутренней — отрицательный.

Известно, что противоположные заряды притягивают друг друга, поэтому положительные заряды наружной стороны и отрица-

тельные заряды внутренней будут располагаться с каждой стороны у поверхности мембраны. Разделение зарядов ведет к появлению разности потенциалов. Электрические силы, обусловленные ею, противодействуют силам концентрационного градиента и препятствуют дальнейшему выходу калия. При определенном потенциале электрические силы, определяемые зарядами на мембране, будут равны противоположно направленным химическим силам, связанным с градиентом концентрации, и тогда никакого перемещения ионов калия уже не произойдет. Такой потенциал называется *потенциалом равновесия для ионов калия* (E_K). Его можно рассчитать по формуле Нернста. Так, для аксона кальмара E_K составляет –75 мВ:

$$E_K = \frac{RT}{nF}\ln\frac{[K^+]_{out}}{[K^+]_{in}} = 2,3\frac{RT}{F}\lg\frac{[K^+]_{out}}{[K^+]_{in}} = 58\lg\frac{[K^+]_{out}}{[K^+]_{in}} =$$

$$= 58\lg\frac{20}{400} = -75 \text{ мВ},$$

где $[K^+]_{out}$ — концентрация ионов калия снаружи клетки; $[K^+]_{in}$ — концентрация ионов калия внутри клетки.

Аналогичный расчет, выполненный для кардиомиоцитов, демонстрирует E_K величиной –90 мВ, поскольку концентрация K^+ внутри кардиомиоцита равна примерно 145 ммоль/л, а во внешней среде — около 4 ммоль/л.

Сходным образом для аксона кальмара можно рассчитать равновесный потенциал для ионов Na^+:

$$E_{Na} = \frac{RT}{nF}\ln\frac{[Na^+]_{out}}{[Na^+]_{in}} = 2,3\frac{RT}{F}\lg\frac{[Na^+]_{out}}{[Na^+]_{in}} = 58\lg\frac{[Na^+]_{out}}{[Na^+]_{in}} =$$

$$= 58\lg\frac{440}{50} = +55 \text{ мВ}.$$

Аналогичный расчет, выполненный для кардиомиоцитов, демонстрирует E_{Na} величиной +57 мВ, поскольку концентрация ионов Na^+ внутри кардиомиоцита равна примерно 15 ммоль/л, а во внешней среде — около 145 ммоль/л.

Рассчитаем теперь равновесный потенциал у аксона для ионов Ca^{2+}. Он определяется как

$$E_{Ca} = \frac{RT}{nF}\ln\frac{[Ca^{2+}]_{out}}{[Ca^{2+}]_{in}} = 2,3\frac{RT}{2F}\lg\frac{[Ca^{2+}]_{out}}{[Ca^{2+}]_{in}} = 29\lg\frac{[Ca^{2+}]_{out}}{[Ca^{2+}]_{in}} =$$

$$= 29\lg\frac{10}{0,4} = -40 \text{ мВ}.$$

Аналогичный расчет, выполненный для кардиомиоцитов, демонстрирует E_{Ca} величиной +125 мВ, поскольку концентрация ионов Ca^{2+} внутри кардиомиоцита равна около 0,0001 ммоль/л, а во внешней среде — около 2 ммоль/л.

В заключение необходимо обсудить вопрос, связанный с ионами Cl^-. Теоретически равновесный потенциал для ионов Cl^- в аксоне кальмара можно также рассчитать, зная концентрации этого иона по обе стороны мембраны и представляя, что в уравнении Нернста отношение концентраций меняется:

$$E_{Cl} = \frac{RT}{nF}\ln\frac{[Cl^-]_{in}}{[Cl^-]_{out}} = 2{,}3\frac{RT}{F}\lg\frac{[Cl^-]_{in}}{[Cl^-]_{out}} = 58\lg\frac{[Cl^-]_{in}}{[Cl^-]_{out}} =$$

$$= 58\lg\frac{40}{560} = -60\ \text{мВ}.$$

Из этого следует, что ионы Cl^- должны создавать такой же потенциал, как и ионы K^+. Действительно, потенциал равновесия этих ионов очень близок. Взаимно противоположное распределение ионов K^+ и Cl^- создается благодаря тому, что на концентрацию K^+ накладываются специфические ограничения, а для концентрации Cl^- этих ограничений нет. Это позволяет ионам Cl^- распределиться (путем перемещения в клетку или из клетки) в соответствии с мембранным потенциалом, задаваемым ионами K^+. В отличие от Cl^- концентрация K^+ не может быть изменена и относительно постоянна. Этому способствует Na^+/K^+-насос.

Таким образом, ионы Cl^- не вносят вклада в мембранный потенциал, так как их градиент концентрации подстраивается под градиент концентрации K^+, чтобы быть обратным ему.

В миокардиальных клетках ионы Cl^- также, по-видимому, распределяются пассивно. При этом внутриклеточная концентрация Cl^- оказывается очень низкой вследствие наличия отрицательного потенциала внутри клетки, который выталкивает отрицательно заряженные ионы Cl^- до тех пор, пока их распределение не придет в равновесие с потенциалом покоя. Принимая внеклеточную концентрацию Cl^- за 120 ммоль/л и величину мембранного потенциала за –80 мВ, концентрация Cl^- будет равна 5,9 ммоль/л. Однако во время потенциала действия потенциал клетки меняется в положительную сторону, вызывая поступление Cl^- в клетку (это показано в виде входящего тока ионов Cl^-, I_{Cl}), следовательно, концентрация хлора увеличивается. Таким образом, в миокардиальных клетках сокращающегося сердца уровень Cl^- должен зависеть от частоты и длительности потенциала действия.

5.3.4. Потенциал покоя. Уравнение Гольдмана

Значение потенциала покоя у разных клеток варьирует в широких пределах, близких к E_K для данного типа клетки. Небольшие отклонения от E_K обусловлены некоторой проницаемостью мембраны для натрия. Эти отклонения были учтены в уравнении, выведенном Д. Гольдманом (D. Goldman):

$$V_m = \frac{RT}{F}\ln\frac{P_K\left[K^+\right]_{out} + P_{Na}\left[Na^+\right]_{out} + P_{Cl}\left[Cl^-\right]_{in}}{P_K\left[K^+\right]_{in} + P_{Na}\left[Na^+\right]_{in} + P_{Cl}\left[Cl^-\right]_{out}}.$$

В этом уравнении учитывали концентрацию трех главных ионов и величины относительной проницаемости для них. Эта формула была использована А. Ходжкиным и Б. Катцом для определения отношений проницаемости мембраны гигантского аксона кальмара для различных ионов. Было обнаружено, что

$$P_K : P_{Na} : P_{Cl} + 1 : 0{,}04 : 0{,}45.$$

5.3.5. Электродвижущая сила для ионов и ионные токи

Электрохимическая движущая сила для каждого иона представляет собой алгебраическую разность между равновесным потенциалом для данного иона и электродвижущей силой, например в виде отрицательного потенциала покоя. На примере параметров кардиомиоцитов, имеющих потенциал покоя, равный –80 мВ, рассмотрим электрохимический потенциал, мВ:

$$V_{Na} = (E_m - E_{Na}) = -80 - (+57) = -137;$$
$$V_{Ca} = (E_m - E_{Ca}) = -80 - (+125) = -205;$$
$$V_K = (E_m - E_K) = -80 - (-90) = +10;$$
$$V_{Cl} = (E_m - E_{Cl}) = -80 - (-80) = 0.$$

Знак «–» означает, что движущая сила способствует движению ионов в клетку, а знак «+» — что она направляет движение ионов из клетки. В этом случае значение суммарного тока для каждого иона (I_i) равно величине электрохимической движущей силы (электрохимического потенциала), умноженной на проводимость мембраны для иона (g_i). Это является определенной модификацией закона Ома:

$$I = V/R = gV.$$

Таким образом, суммарный ток для основных ионов может быть выражен в виде следующих зависимостей:

$$I_{Na} = g_{Na}(E_m - E_{Na});\ I_{Ca} = g_{Ca}(E_m - E_{Ca});$$

$$I_K = g_K(E_m - E_K);\ I_{Cl} = g_{Cl}(E_m - E_{Cl}).$$

Для поддержания постоянной величины потенциала покоя необходимо выполнение условия $I_{Na} = I_K$. Иначе говоря, входящий ток должен быть равен выходящему, но направлен в противоположную сторону. Таким образом, несмотря на то что в состоянии покоя движущая сила для Na^+ (−137 мВ) гораздо больше движущей силы для K^+(+10 мВ), токи, переносимые этими ионами, равны, поскольку g_K значительно больше g_{Na}. Так как отношение движущих сил примерно равно 10 (137 мВ/10 мВ), то отношение проводимостей g_{Na}/g_K тоже должно быть около 1 : 10, потому что g_K значительно больше g_{Na}. Понятно, что величина потенциала покоя должна быть ближе к E_K, чем к E_{Na}.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Биофизика / [Ю. А. Владимиров, Д. И. Рощупкин, А. Я. Потапенко, А. И. Деев]. — М. : Медицина, 1983.

Костюк П. Г. Механизмы электрической возбудимости нервной клетки / П. Г. Костюк, О. А. Крышталь. — М. : Наука, 1981.

Магура И. С. Проблемы электрической возбудимости нейрональной мембраны / И. С. Магура. — Киев : Наукова Думка, 1981.

Фундаментальная и клиническая физиология / под ред. А. Г. Камкина, А. А. Каменского. — М. : Изд. центр «Академия», 2004.

Ходоров Б. И. Общая физиология возбудимых мембран / Б. И. Ходоров. — М. : Наука, 1975.

Ходоров Б. И. Проблема возбудимости / Б. И. Ходоров. — Л. : Медицина, 1969.

Hille B. Ionic channels of excitable membranes / B. Hille. — Sunderland. Mass. : Sinauer Associates, 1992.

Hodgkin A. L. The Conduction of the Nervous Impulse / A. L. Hodgkin. — Liverpool University Press, 1964.

Kandel E. R. Cellular basis of behavior / E. R. Kandel. — N.Y. : Freeman and Company, 1976.

Katz B. Nerve, Muscle and Synapse / B. Katz. — McGraw-Hill Book Company, 1966.

Molecular cell biology / ed. by H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk et al. — 3rd ed. — N.Y. : Freeman and Company, 1995.

Physiology / ed by R. M. Bern, M. N. Levy. — 2nd ed. — N.Y. : The C.V. Mosby Company, 1988.

ГЛАВА 6

ПОТЕНЦИАЛЫ КЛЕТКИ, ОПРЕДЕЛЯЕМЫЕ ПАССИВНЫМ ИОННЫМ ТРАНСПОРТОМ

6.1. Методы измерения потенциала мембраны

В основе измерения мембранного потенциала лежат микроэлектродные исследования возбудимых тканей, которые начались с работы Г.Линга (G. Ling) и Р.Герарда (R. Gerard), применивших микроэлектроды для измерения потенциала покоя мышцы лягушки. Однако подлинный расцвет микроэлектродных исследований клеток возбудимых тканей наступил после работ У.Л.Настука (W. L. Nastuk) и А.Л.Ходжкина, зарегистрировавших потенциалы действия, и работ П.Фатта (P. Fatt) и Б.Катца, использовавших микроэлектроды не только для регистрации биоэлектрических параметров клеток, но и для электрической внутриклеточной поляризации мембран мышечных клеток. Еще один вариант использования микроэлектродов был предложен У.Л.Настук, который аппликировал ацетилхолин на мембрану клетки через микроэлектрод.

Таким образом, были предложены три способа использования микроэлектродов, которые дошли до настоящих дней в той или иной технической модификации. Во-первых, это внутриклеточная регистрация при помощи микроэлектрода биоэлектрических параметров мембран клеток; во-вторых — поляризация через микроэлектрод мембран клеток электрическим током; в-третьих, подача через микроэлектрод ионов или биологически активных соединений, причем метод подачи веществ на поверхность мембраны клетки назван *аппликацией*, а метод введения веществ внутрь клетки — *ионофорезом*.

По терминологии Р.Д.Первис (R. D. Purves) стеклянная микропипетка становится микроэлектродом после заполнения ее сквозного продольного канала электролитом и образования контакта (тем или иным способом) электролита с электронно-измерительной схемой. Не будем останавливаться на методах микроэлектродной техники, отправляя заинтересованного читателя к книге А.Г.Камкина, И.С.Киселевой «Техническое обеспечение

микроэлектродного исследования клеток». Вместе с тем для дальнейшего понимания читателем текста, основанного на определенных методах и технических решениях, нам необходимо коротко остановиться на интегральных микросхемах и усилителях, выполненных на них.

Образование контакта электролита и микроэлектрода может быть двух типов и зависит от того, какой биологический объект изучается.

Первый тип — так называемая жесткая фиксация микроэлектрода, которая применяется для внутриклеточных исследований неподвижных тканей или клеток, например клеток нервной системы. В этом случае микроэлектрод вводят в специальный неподвижный держатель, закрепленный на микроманипуляторе и заполненный агаром, сваренным на электролите. Контакт агара с электронно-измерительной схемой осуществляется за счет введения в него хлорсеребряного проводника, другой конец которого соединен с проводом входа усилителя.

Второй тип — так называемый плавающий микроэлектрод, который применяется для внутриклеточных исследований сокращающейся ткани, например миокарда. В этом случае непосредственно в электролит микроэлектрода вводят хлорсеребряную иглу, соединенную с платино-иридиевой проволокой диаметром не более 30 мкм, которая другой стороной связана с входом усилителя.

Для исследований внутриклеточного потенциала мембраны применяют крайне простую измерительную аппаратуру, представляющую собой усилитель на основе микросхемы, имеющей высокое входное сопротивление, на несколько порядков превышающее сопротивление мембраны клетки и микроэлектрода, включенный в режиме повторителя (рис. 6.1). Многие годы были распространены предварительные усилители на базе микросхемы К544УД1А (выпускалась в 1980-е гг.).

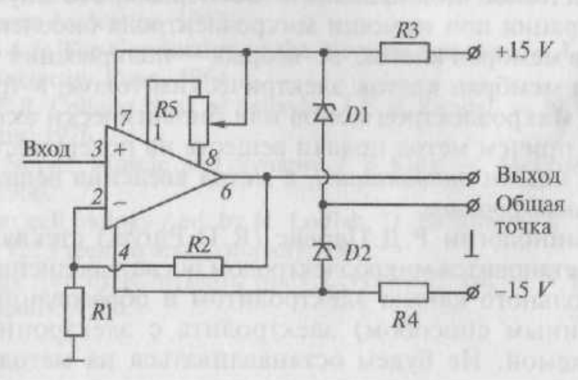


Рис. 6.1. Принципиальная схема неинвертирующего усилителя, выполненного на базе операционного усилителя К544УД1А

Положительный вход подобного усилителя подключают к микроэлектроду, а выход — к осциллографу для регистрации внутриклеточного потенциала. Для того чтобы цепь была замкнута, в раствор с тканью вводят так называемый индифферентный электрод.

6.2. Потенциал покоя клетки

Потенциал покоя клетки определяется работой Na^+/K^+-АТФазы и потоком ионов Na^+ и K^+ по каналам утечки (рис. 6.2, *а*). Рас-

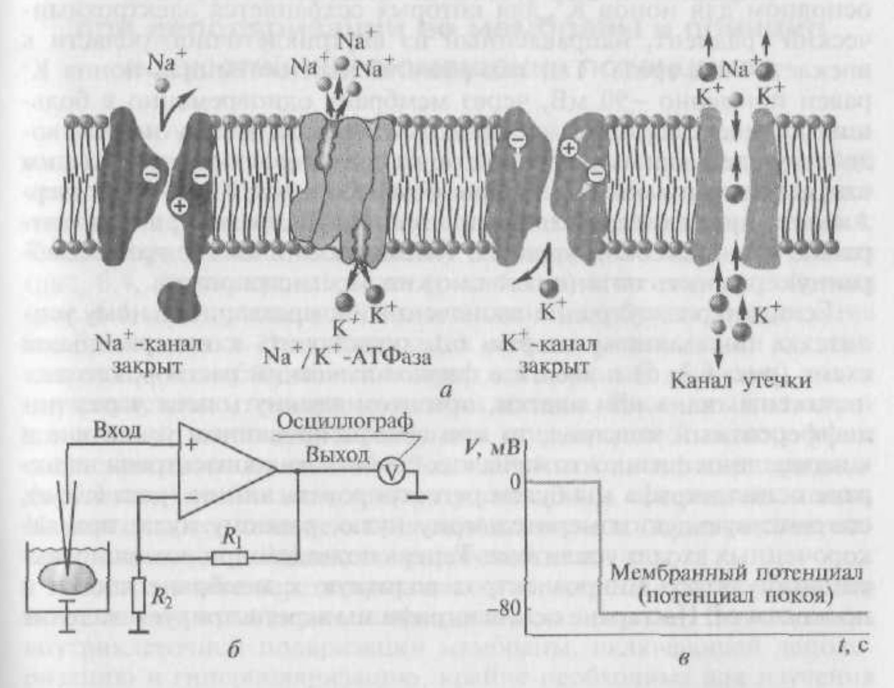


Рис. 6.2. Принцип регистрации потенциала клетки:

а — структуры мембраны, формирующие потенциал покоя. Представлены мембрана клетки, Na^+-канал, K^+-канал и Na^+/K^+-АТФаза, которая выкачивает ионы Na^+ из клетки против его электрохимического градиента, одновременно вводя ионы K^+ в клетку также против его электрохимического градиента. Таким образом осуществляется возникновение негативного внутриклеточного потенциала мембраны клетки — потенциала покоя клетки. Существуют каналы утечки, через которые осуществляются незначительный вход ионов Na^+ в клетку и превышающий его выход ионов K^+ из клетки. Согласно принятой в настоящее время точке зрения каналы утечки — это потенциалнезависимые каналы, названные K_{2P}-каналами, поскольку они содержат две связанные 2S/1P-области, т. е. это димер 4S/2P. Именно эти каналы стабилизируют потенциал покоя на уровне ниже критического потенциала. Характеристики их проводимости соответствуют токам утечки, о существовании которых было предположено ранее; *б* — измерительная схема; *в* — потенциал покоя

пределение этих ионов поддерживается механизмом активного транспорта Na^+ и K^+, или электрогенным Na^+/K^+-насосом, который удерживает внутри клетки концентрацию Na^+ на низком, а концентрацию K^+ на высоком уровнях, транспортируя Na^+ из клетки наружу, а K^+ из наружной среды внутрь. Поскольку равновесный потенциал для ионов Na^+ равен +55 мВ, а потенциал мембраны клетки, лежит в диапазоне от −60 до −80 мВ, существует движущая сила для ионов Na^+, и они в небольшом количестве устремляются по каналам утечки внутрь клетки, что могло бы деполяризовать ее мембрану. Однако каналы утечки проницаемы в основном для ионов K^+, для которых сохраняется электрохимический градиент, направленный из внутриклеточной области к внеклеточной среде. Так как равновесный потенциал ионов K^+ равен примерно −90 мВ, через мембрану одновременно в больших количествах проходят ионы K^+, покидая клетку и противодействуя тем самым деполяризации, обусловленной небольшим входящим током ионов Na^+. При этом работа Na^+/K^+-АТФазы удерживает внутри клетки концентрацию Na^+ на низком, а концентрацию K^+ на высоком уровнях. Имеющуюся в клетке трансмембранную разность потенциалов можно зарегистрировать.

Если микроэлектрод, подключенный к предварительному усилителю, показанному на рис. 6.1, подключить к измерительной схеме (рис. 6.2, *б*) и ввести в физиологический раствор, где расположены ткань или клетки, при этом замкнуть цепь через индифферентный электрод, то при сбалансированном усилителе и компенсации физико-химических свойств микроэлектрода на экране осциллографа мы будем регистрировать линию (рис. 6.2, *в*), соответствующую измерительному нулю, равному нулю при закороченных входах усилителя. Теперь подведем при помощи микроманипулятора микроэлектрод вплотную к мембране клетки и проколем ее. На экране осциллографа мы зарегистрируем падение

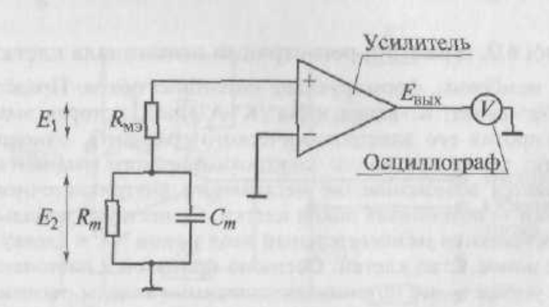


Рис. 6.3. Эквивалентная схема измерения потенциалов клетки:

E_1 — микроэлектрод; E_2 — мембрана клетки, являющаяся источником сигнала; $R_{мэ}$ — сопротивление микроэлектрода; R_m — входное сопротивление клетки; C_m — емкость клетки

нулевого потенциала и разность потенциалов между внутренней и наружной средами клетки, величина которой для разных клеток лежит в диапазоне от −40 до −80 мВ. Именно эта разность, представленная на рис. 6.2, *в*, является потенциалом покоя клетки.

Эквивалентная электрическая схема, включающая измерительную часть, микроэлектрод и мембрану клетки, представлена на рис. 6.3.

6.3. Потенциалы клетки, возникающие при деполяризации ее мембраны и принцип искусственного смещения потенциала

Помимо потенциала покоя (см. рис. 6.2, *в* и рис. 6.4, *а*), механизм которого мы обсуждали в предыдущей главе, пассивный транспорт ионов через ионные каналы мембраны определяет возникновение еще трех потенциалов, представленных на рис. 6.4. К ним принадлежат пассивный электротонический потенциал (рис. 6.4, *б*), локальный ответ (рис. 6.4, *в*) и потенциал действия (рис. 6.4, *г*). Однако для их возникновения требуется поляризация мембраны клетки. Эта поляризация может осуществляться как внеклеточно, что обычно используют на нервных волокнах, так и внутриклеточно, что применяют на клетках. Пассивный электротонический потенциал зарождается при заведомо подпороговом смещении потенциала покоя. Локальный ответ возникает при подпороговом, но близком к порогу смещении потенциала покоя. Наконец, потенциал действия зарождается, когда смещение потенциала покоя доведено до пороговой величины.

Однако чтобы зарегистрировать эти потенциалы, необходимо искусственное смещение потенциала покоя клетки. Возможность внутриклеточной поляризации мембраны, включающей деполяризацию и гиперполяризацию, крайне необходима для изучения свойств мембраны. Искусственное смещение мембранного потенциала дает возможность не только изучать пассивные электрические характеристики клеток, но и исследовать межклеточные взаимодействия, осуществляемые непосредственно через высокопроницаемые контакты мембран клеток.

Однако возможность внутриклеточной поляризации мембран должна непременно сочетаться с возможностью одновременной регистрации биоэлектрической активности клеток и тех изменений этой активности, которые возникают вследствие приложения электрического тока.

В наиболее примитивном виде принцип внутриклеточной поляризации мембран при возможности одновременной регистрации биоэлектрической активности клеток представлен на рис. 6.5.

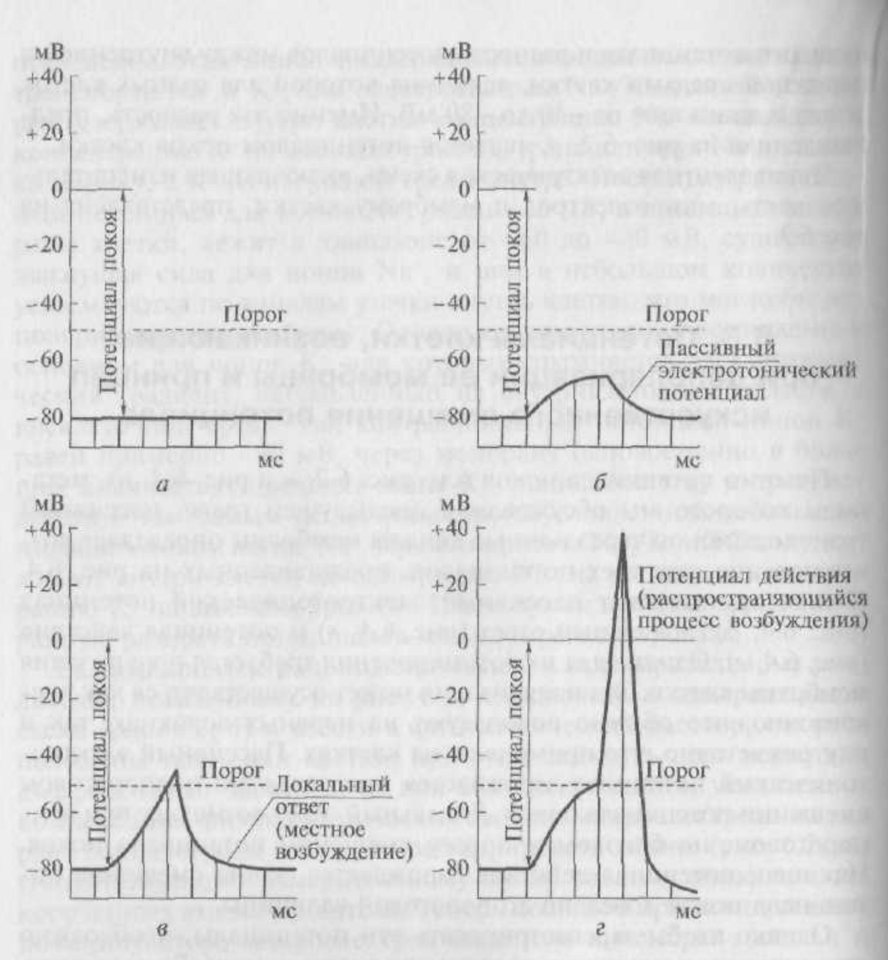


Рис. 6.4. Изменение мембранного потенциала в зависимости от силы раздражения:

а — потенциал покоя; *б* — пассивный электротонический потенциал; *в* — локальный ответ; *г* — потенциал действия

В этом случае в клетку вводится одновременно два микроэлектрода, один из которых является поляризующим, а другой — регистрирующим (рис. 6.5, *а*). Возникающая при этом картинка на экране двухлучевого осциллографа показана на рис. 6.5, *б*. На верхнем первом канале регистрируется величина поляризующего сигнала, а на нижнем втором канале — мембранный потенциал и его искусственное смещение, вызванное поляризацией мембраны. Следует помнить, что прямое подключение поляризующего микроэлектрода к генератору невозможно. Для этого существуют специальные схемы.

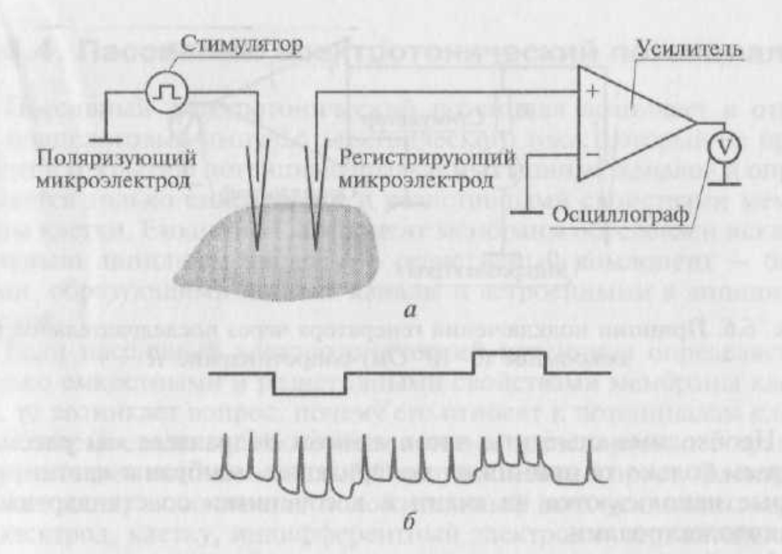


Рис. 6.5. Принцип внутриклеточной поляризации мембраны при одновременной регистрации биоэлектрической активности клеток:

а — введение в клетку двух микроэлектродов, из которых один поляризующий, а второй — регистрирующий; *б* — вид записи на экране двухканального осциллографа. Верхняя кривая — потенциал, подаваемый со стимулятора (гипер- и деполяризация); нижняя — реакция клетки на внутриклеточную поляризацию (гипер- и деполяризация)

Вместе с тем даже при технически грамотном подходе использование двух микроэлектродов для введения в одну клетку — задача весьма сложная, даже если работа выполняется на гигантских нейронах беспозвоночных. Если же необходимо изучать межклеточное, например электротоническое, взаимодействие двух нейронов, то в препарат необходимо ввести четыре микроэлектрода (по два в каждую клетку), что практически невыполнимо. В то же время при изучении мелких клеток ввести два микроэлектрода в одну клетку просто невозможно. В этом случае необходимо, чтобы один микроэлектрод выполнял роль и регистрирующего, и поляризующего.

Известны три реальные электронно-измерительные схемы, позволяющие при помощи одного микроэлектрода измерять биоэлектрические параметры клеток и осуществлять искусственную поляризацию их мембран: 1) схема попеременного подведения тока и регистрации биопотенциалов клетки; 2) так называемая мостовая измерительная схема; 3) схема подключения источника напряжения через последовательное сопротивление, выполненная на базе высокоомных радиоэлектронных элементов. Последняя, на наш взгляд, представляет наибольший интерес, поэтому мы остановимся на ней подробно.

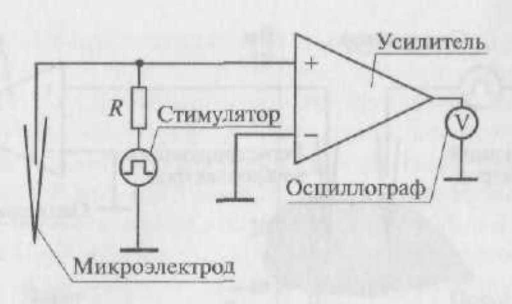


Рис. 6.6. Принцип подключения генератора через последовательное высокоомное ($5 \cdot 10^9$ Ом) сопротивление *R*

Необходимо отметить, что в данном подразделе мы рассматриваем только те принципы поляризации мембраны клетки, которые используются на ткани и в сочетании со стандартными микроэлектродами.

У изолированных клеток или на тончайших срезах ткани для регистрации биопотенциалов и одновременной поляризации клетки применяют определенные подходы и специальную аппаратуру. Такая схема представлена на рис. 6.6. Метод регистрации потенциала клетки при одновременном его смещении обычно называют current clamp (фиксация тока). Сопротивление *R* должно быть достаточно высоким, чтобы предотвратить утечку тока из клетки в промежутках между импульсами стимуляции. Для этого оно должно в 20—50 раз превышать входное сопротивление клетки.

Сопротивление *R* должно быть также достаточно высоким для того, чтобы при подаче импульса стимуляции ток не зависел от сопротивления микроэлектрода. Для этого оно также должно в 20—50 раз превышать сопротивление микроэлектрода.

Обычно требуемая величина *R* лежит в диапазоне от 10^9 до 10^{10} Ом. Эти резисторы достаточно редки. Кроме того, они требуют специального обращения, так как любое повреждение центрального цветного кольца, пыль или отпечатки пальцев на поверхности существенно уменьшают их величину. Вместе с тем эта схема является наиболее практичной, поскольку не требует предварительной настройки и подстройки в процессе эксперимента. Кроме того, со стимулятора можно подавать импульсы любой длительности. При необходимости подавать импульсы тока с быстрыми фронтами нарастания резистор *R* необходимо подключить в непосредственной близости к микроэлектроду для сведения к минимуму влияния паразитной емкости. Если применяемое сопротивление велико, то для получения тока в несколько наноампер необходимо подавать значительное напряжение.

6.4. Пассивный электротонический потенциал

Пассивный электротонический потенциал возникает в ответ на подпороговый импульс электрического тока, который не приводит к открытию потенциалуправляемых ионных каналов и определяется только емкостными и резистивными свойствами мембраны клетки. Емкостной компонент мембраны обусловлен исключительно липидным бислоем, а резистивный компонент — белками, образующими ионные каналы и встроенными в липидный бислой.

Если пассивный электротонический потенциал определяется только емкостными и резистивными свойствами мембраны клетки, то возникает вопрос, почему его относят к потенциалам клетки, которые связаны с пассивным ионным транспортом, т. е. транспортом через ионные каналы? Ответ достаточно прост. Электрическая цепь, включающая положительный вход усилителя, микроэлектрод, клетку, индифферентный электрод и отрицательный вход усилителя, которая показана, например, на рис. 6.7, может быть замкнута только в том случае, если мембрана имеет возможность проводить через себя электрический ток, носителем которого в системе клетки и внеклеточного раствора являются ионы. Эту возможность дают постоянно открытые каналы утечки, о которых речь шла ранее. Однако пассивный электротонический потенциал не приводит к открытию потенциалуправляемых ионных каналов. В этом случае емкостные и резистивные свойства мембраны клетки достаточно постоянны. Емкостные свойства в основном определяются липидным бислоем, а сопротивление клетки — сопротивлением, которое определяется открытыми каналами утечки.

Как отмечалось, мембрана клетки представляет собой липидный бислой с включенными в него белками, часть из которых — ионные каналы, связывающие внутреннюю и внешнюю среду клетки. Липидный бислой можно уподобить конденсатору, две обкладки которого находятся на небольшом расстоянии друг от друга, а при подаче тока одна обкладка заряжается положительно, а другая — отрицательно. Ионные каналы липидного бислоя или, в этом случае, мембраны клетки обладают проводимостью; следовательно, мембрана характеризуется электрическим сопротивлением (см. рис. 3.1 и 3.2, *б*).

На рис. 6.7, *а* приведена блок-схема для регистрации потенциала покоя и его смещения для получения пассивного электротонического потенциала. На рис. 6.7, *б* изображена эквивалентная электрическая схема для небольшого участка клетки, полезная для понимания протекания тока и изменений мембранного потенциала. На подаваемый ток и изменения сопротивления и напряжения она реагирует точно так же, как и мембрана, и в то же

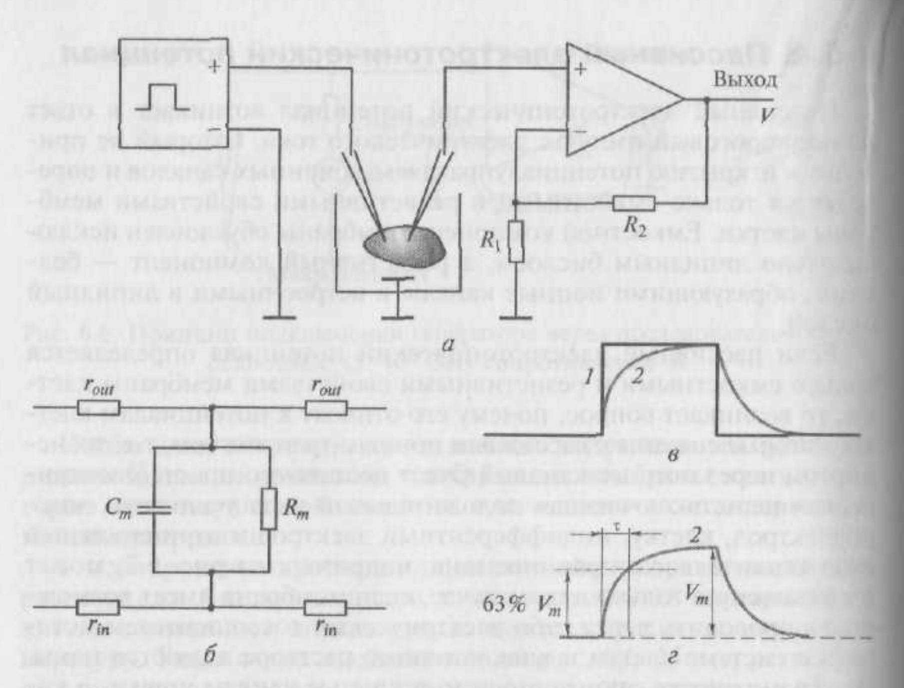


Рис. 6.7. Пассивный элекротонический потенциал, направленный в сторону деполяризации:

а — принципиальная схема регистрации пассивного электротонического потенциала; *б* — эквивалентная электрическая схема мембраны, демонстрирующая, что пассивный электротонический потенциал определяется только емкостными и резистивными свойствами мембраны; *в* — пассивный электротонический потенциал (кривая *2*), наложенный на раздражающий прямоугольный импульс электрического тока *1*; *г* — параметры пассивного электротонического потенциала; V_m — амплитуда; τ — время релаксации мембраны (время, за которое пассивный электротонический потенциал достигает 63 % амплитуды)

время эта схема отображает реальные физические компоненты, которые можно соединить проводниками, проверить в работе и охарактеризовать количественно.

Данная схема включает емкостной компонент мембраны (C_m) и резистивный компонент (R_m), а также учитывает сопротивления внешней среды r_{out} и сопротивление цитозоля r_{in}. Поскольку значения r_{out} и r_{in} малы, ими можно пренебречь, хотя это достаточно грубая аппроксимация. Кроме того, r_{out} много меньше r_{in}.

Если на мембрану через один микроэлектрод подать подпороговый прямоугольный импульс электрического тока положительной полярности (рис. 6.7, *в* — импульс *1*), то усилитель, подключенный ко второму микроэлектроду, зарегистрирует изменения мембранного потенциала, форма которого отличается от прямоугольника (рис. 6.7, *в* — кривая *2*). Это и есть пассивный электро-

тонический потенциал (рис. 6.7, *г*). Обсудим механизм его возникновения и его форму.

Итак, если мы подаем на мембрану ток, то его протекание через R_m описывается законом Ома:

$$I_R = \frac{V_m}{R_m},$$

где V_m — потенциал на R_m.

Протекание тока через емкость можно рассчитать следующим образом:

$$I_C = C_m \frac{dV_m}{dt}.$$

Таким образом, для общего тока, текущего в покое через мембрану, получаем

$$I_m = \frac{V_m}{R_m} + C_m \frac{dV_m}{dt}.$$

Емкостный компонент мембраны C_m обусловлен исключительно липидным бислоем, а резистивный компонент R_m — белками, образующими ионные каналы и встроенными в липидный бислой. Представим это уравнение в виде

$$I_m = \frac{V(t) - V_0}{R_m} + C_m \frac{dV(t)}{dt}; \;\; V(t = 0) = V_0$$

или иначе как

$$\frac{IR - (V(t) - V_0)}{RC} = \frac{dV(t)}{dt}$$

и проинтегрируем по времени t:

$$dt = \frac{RC dV(t)}{IR - (V(t) - V_0)},$$

$$\int_0^t dt = \int_{V_0}^{V(t)} \frac{RC dV(t)}{IR_m - (V(t) - V_0)},$$

то получим:

$$V(t) = V_0 + R_m I_m \left(1 - e^{-\frac{t}{C_m R_m}}\right),$$

где $R_m C_m = \tau_m$ и называется *постоянной времени*.

Постоянная времени мембраны τ_m является одной из важнейших характеристик пассивного электротонического потенциала, которая отражает пассивные свойства мембраны. Последнее уравнение крайне важно, поскольку величины τ_m и R_m можно в отличие от C_m зарегистрировать экспериментально и, следовательно, таким образом рассчитать C_m. При помощи постоянной времени и R_m полностью описываются пассивные свойства эквивалентной схемы (или мембраны).

Постоянная времени характеризует временной ход изменений мембранного потенциала, т.е. скорость, с которой он меняется при переходе от одного значения к другому. Постоянная времени мембраны — это время, необходимое для того, чтобы импульс постоянного тока зарядил емкость мембраны на 63 % (рис. 6.7, *г*).

Сходная картина возникает, если на мембрану через один микроэлектрод подать аналогичный по силе прямоугольный импульс электрического тока *отрицательной полярности* (рис. 6.8, *а* — импульс *1*). В этом случае пассивный электротонический потенциал будет направлен в отрицательную область (рис. 6.8, *б* — кривая *2*).

Характерной особенностью пассивного электротонического потенциала будет равенство скоростей нарастания и спада экспоненты.

Для различных клеток значения τ_m варьируют от одной до нескольких сотен миллисекунд, однако для одной и той же клетки

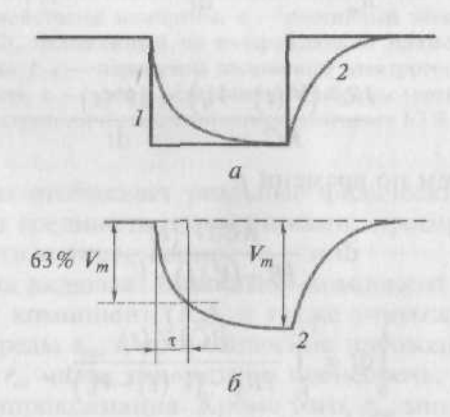


Рис. 6.8. Пассивный элекротонический потенциал, направленный в сторону гиперполяризации:

а — пассивный электротонический потенциал *2*, наложенный на раздражающий прямоугольный импульс электрического тока *1*; *б* — параметры пассивного электротонического потенциала; V_m — амплитуда; τ — время релаксации мембраны (время, за которое пассивный электротонический потенциал достигает 63 % амплитуды)

эта величина будет равна вне зависимости от длительности и направления поляризующего импульса электрического тока. Это еще одна особенность пассивного электротонического потенциала.

Наконец, если дискретно увеличивать амплитуду поляризующего импульса электрического тока, оставаясь, тем не менее, в подпороговом диапазоне его силы, то амплитуда каждого пассивного электротонического потенциала будет равна амплитуде им-

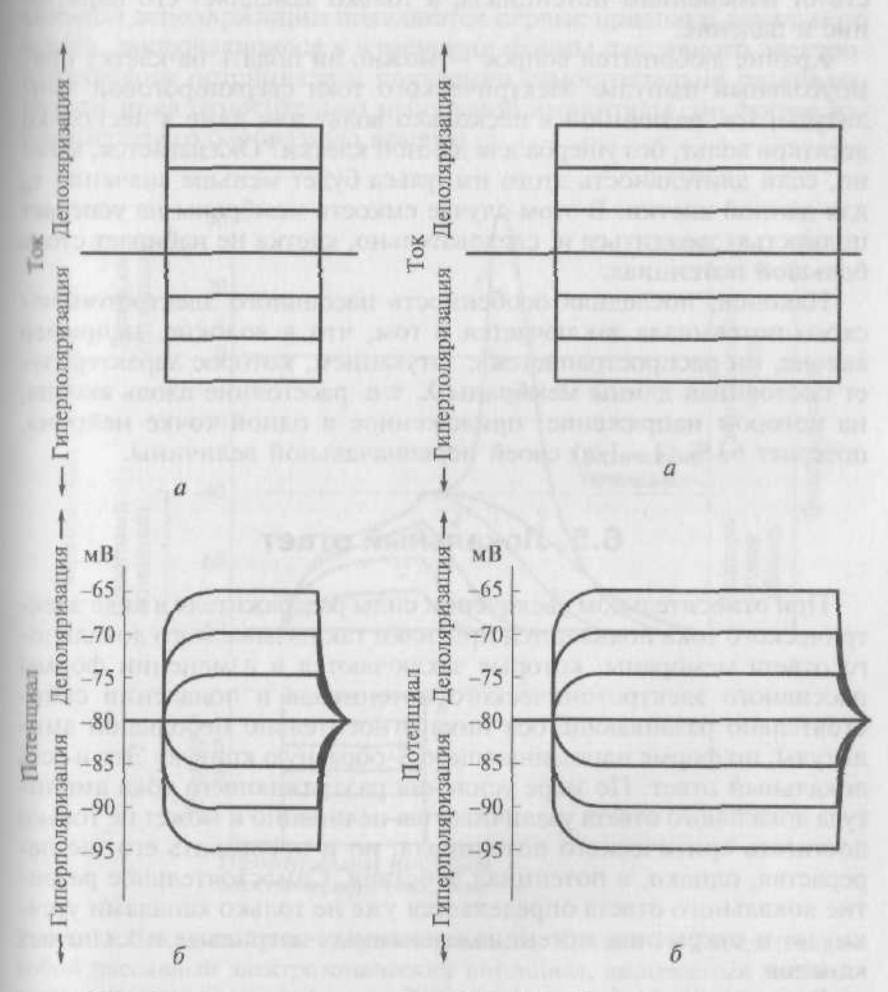


Рис. 6.9. Линейная зависимость между амплитудами:

а — электрического стимула; *б* — пассивного электротонического потенциала

Рис. 6.10. Линейная зависимость при выраженном увеличении длительности поляризующего импульса между амплитудами:

а — электрического стимула; *б* — пассивного электротонического потенциала

пульса тока, его вызывающего. В этом проявляется строго линейная зависимость между амплитудами электрического стимула и пассивного электротонического потенциала (рис. 6.9). Значительное увеличение длительности поляризующего импульса не меняет этой закономерности (рис. 6.10). Ранее мы обсуждали, что как только емкость зарядится до потенциала, равного подаваемому на нее, *емкостной ток прекратится. Таким образом, она не препятствует изменениям потенциала, а только замедляет его нарастание и падение.*

Крайне любопытен вопрос — можно ли подать на клетку прямоугольный импульс электрического тока сверхпороговой амплитуды, т.е. величиной в несколько вольт или даже в несколько десятков вольт, без ущерба для данной клетки? Оказывается, можно, если длительность этого импульса будет меньше значения τ_m для данной клетки. В этом случае емкость мембраны не успевает полностью зарядиться и, следовательно, клетка не набирает столь большой потенциал.

Наконец, последняя особенность пассивного электротонического потенциала заключается в том, что в волокне, например аксоне, он распространяется с затуханием, которое характеризует постоянная длины мембраны λ, т.е. расстояние вдоль аксона, на котором напряжение, приложенное в одной точке нейрона, потеряет 63 % (1 – 1/e) своей первоначальной величины.

6.5. Локальный ответ

При относительном увеличении силы раздражителя в виде электрического тока появляются признаки так называемого локального ответа мембраны, которые заключаются в изменении формы пассивного электротонического потенциала и появлении самостоятельно развивающегося пика относительно небольшой амплитуды, по форме напоминающего S-образную кривую. Это и есть локальный ответ. По мере усиления раздражающего тока амплитуда локального ответа увеличивается нелинейно и может не только достигать критического потенциала, но и превышать его, не перерастая, однако, в потенциал действия. Самостоятельное развитие локального ответа определяется уже не только каналами утечки, но и открытием потенциалзависимых натриевых и калиевых каналов.

В предыдущем подразделе мы обсудили, что механизм пассивного электротонического потенциала определяется только емкостной компонентой мембраны (C_m), обусловленной исключительно липидным бислоем, и резистивной компонентой (R_m), определяемой *встроенными в липидный бислой ионными каналами.* При этом в покое ток, протекающий через каналы утечки для ионов

Na^+ и K^+, зависит только от *уровня деполяризации*. *Если дискретно увеличивать амплитуду поляризующего импульса* электрического тока, оставаясь в подпороговом диапазоне значений его силы, то амплитуда каждого пассивного электротонического потенциала будет пропорциональна амплитуде импульса тока, его вызывающего. В этом проявляется строго линейная зависимость между амплитудами электрического стимула и пассивного электротонического потенциала (рис. 6.11, кривые *1* и *2*). Однако при более сильной деполяризации появляются первые признаки локального ответа, заключающиеся в изменении формы пассивного электротонического потенциала и появлении самостоятельно развивающегося пика относительно небольшой амплитуды, по форме напоминающего S-образную кривую.

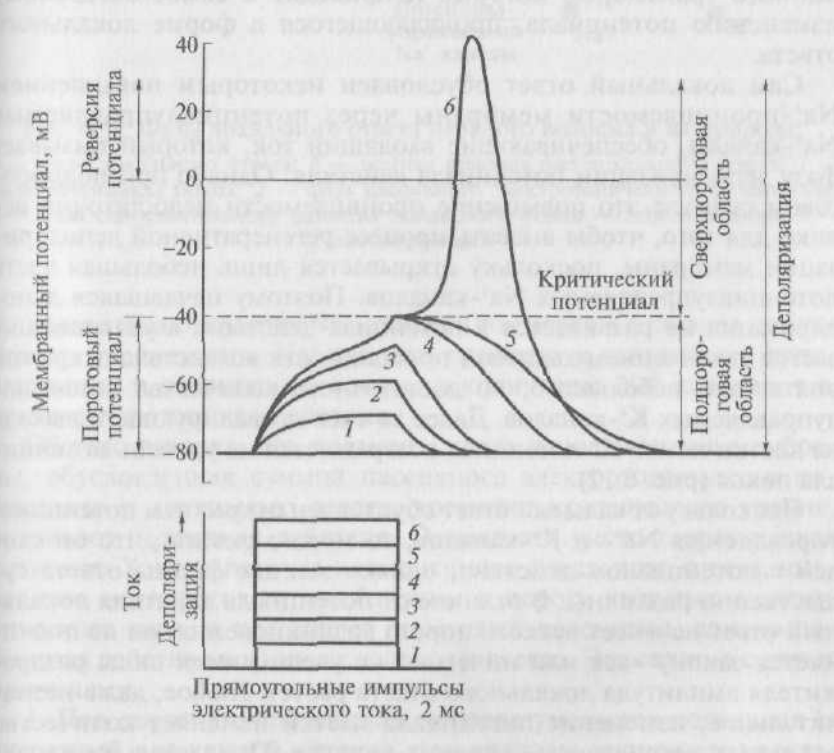


Рис. 6.11. Локальный ответ нервного волокна. Кривые *1* и *2* представляют собой пассивный электротонический потенциал, вызываемый увеличивающимися по амплитуде деполяризующими импульсами электрического тока. На кривых *3, 4* и *5* к пассивному электротоническому потенциалу присоединяется деполяризация в форме локального ответа. При пороговой силе тока локальный ответ перерастает в потенциал действия *6*. Внизу показаны ступеньки деполяризующих импульсов электрического тока

Первые признаки локального ответа выявляются при действии стимулов, составляющих приблизительно 75 % пороговой величины (рис. 6.11, кривые *3*, *4* и *5*). По мере дальнейшего усиления раздражающего тока амплитуда локального ответа увеличивается и может не только достигать критического потенциала, но и превышать его.

Таким образом, условно можно говорить, что локальный ответ включает в себя две стадии: стадию пассивного электротонического потенциала, при которой не происходит изменений потенциалзависимых ионных токов через мембрану, и стадию собственно локального ответа. В последнем случае в механизме деполяризации мембраны наряду с емкостными и резистивными свойствами существенную роль будут играть также изменения ионного транспорта, которые и приводят к самостоятельному изменению потенциала, проявляющегося в форме локального ответа.

Сам локальный ответ обусловлен некоторым повышением Na^+-проницаемости мембраны через потенциалуправляемые Na^+-каналы, обеспечивающие входящий ток, который вызывает фазу деполяризации потенциала действия. Однако при подпороговом стимуле это повышение проницаемости недостаточно велико для того, чтобы вызвать процесс регенеративной деполяризации мембраны, поскольку открывается лишь небольшая часть потенциалуправляемых Na^+-каналов. Поэтому начавшаяся деполяризация не развивается в потенциал действия, а уравновешивается увеличением калиевой проводимости вследствие открытия опять таки небольшого, но достаточного количества потенциалуправляемых K^+-каналов. Далее за счет превалирующего выхода из клетки ионов K^+ потенциал возвращается на уровень потенциала покоя (рис. 6.12).

Поскольку локальный ответ обусловлен открытием потенциалуправляемых Na^+- и K^+-каналов, то можно сказать, что он сходен с потенциалом действия, однако эти две формы ответа существенно различны. В отличие от потенциала действия локальный ответ не имеет четкого порога возникновения; он не подчиняется закону «все или ничего» — с увеличением силы раздражителя амплитуда локального ответа растет. Любое, даже незначительное, изменение потенциала клетки изменяет количество открытых натриевых и калиевых каналов. Появление же характерного S-образного ответа означает только, что величина локального ответа превышает величину пассивного электротонического потенциала.

При этом не следует забывать, что кинетики открывания потенциалуправляемых Na^+-(быстрые) и K^+-(медленные)каналов различны, поэтому при достижении определенного уровня деполяризации (порог генерации потенциала действия) и соответствен-

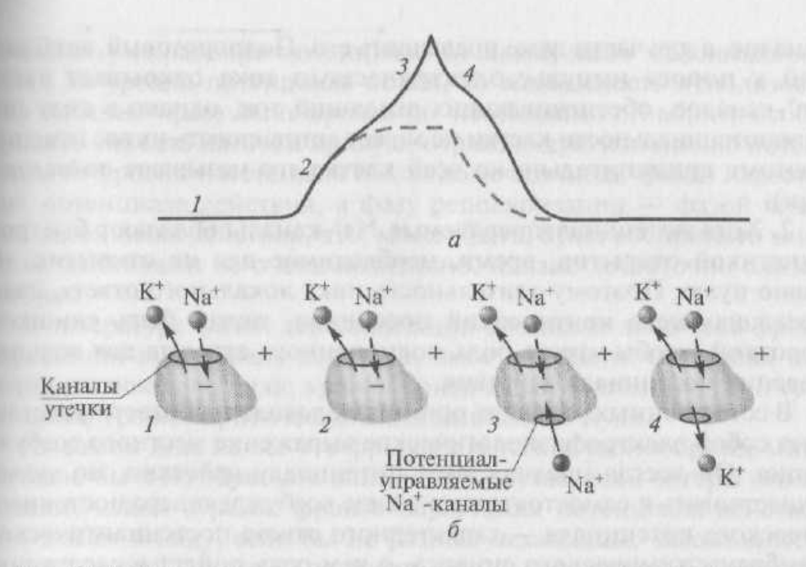


Рис. 6.12. Фазы локального ответа нервного волокна и их природа:

а — фазы локального ответа; *б* — ионная природа фаз локального ответа; *1* — фаза потенциала покоя; *2* — фаза пассивного электротонического потенциала; *3* — фаза самостоятельного развития локального ответа — деполяризация; *4* — реполяризация

но количества открытых Na^+-каналов ток через K^+-каналы не «успевает» уравновесить Na^+-ток, что приводит к дальнейшей деполяризации и открыванию большего количества Na^+-каналов, т.е. возникает потенциал действия.

Обычно говорят, что в момент, когда деполяризация мембраны, обусловленная суммой пассивного электротонического потенциала и локального ответа, достигает критического уровня, возникает потенциал действия. Однако это чисто теоретическая ситуация. Хотя амплитуда полноценного локального ответа, вызванного подпороговым, но близким к порогу импульсом электрического тока, и превышает пороговый потенциал, однако потенциал действия возникает далеко не всегда. Это связано с двумя причинами.

1. Под пороговым потенциалом подразумевается потенциал (а он разный для каждой клетки), при котором открывается достаточное количество натриевых каналов, ток через которые превышает калиевый ток, что приводит в конечном счете к открытию всех Na^+-каналов, обеспечивающих входящий ток, вызывающий фазу деполяризации потенциала действия (несмотря на то что обычно клетки не эквипотенциальны). Условно говоря, если разбить мембрану клетки на участки, то для части из них пороговый потенциал будет достаточным для открытия такого количества

каналов, а для части даже превышать его. Подпороговый, но близкий к порогу импульс электрического тока открывает часть Na^+-каналов, обеспечивающих входящий ток, однако в силу неэквипотенциальности клетки не может активировать их все (именно поэтому применительно ко всей клетке его называют *подпороговым*).

2. Хотя потенциалуправляемые Na^+-каналы обладают быстрой кинетикой открытия, время, необходимое для их открытия, не равно нулю. Поэтому длительность пика локального ответа, даже превышающего критический потенциал, может быть слишком короткой, чтобы играть роль полноценного стимула для возникновения потенциала действия.

В естественных условиях организма локальный ответ представляет собой *электрофизиологическое выражение местного возбуждения*. Он всегда предшествует потенциалу действия, но может существовать и самостоятельно в виде возбуждающего постсинаптического потенциала — характерного ответа постсинаптической мембраны химического синапса, о чем речь пойдет в следующих подразделах.

6.6. Потенциал действия

6.6.1. Фазы потенциала действия

При пороговой величине раздражающего электрического стимула возникает потенциал действия, состоящий из фаз деполяризации и реполяризации. В основе механизма фазы деполяризации лежит активация всех потенциалуправляемых Na^+-каналов, в результате чего ионы Na^+ пассивным транспортом входят в клетку, и возникающий при этом ток ведет к смещению мембранного потенциала в положительную область, где потенциалуправляемые Na^+-каналы инактивируются, а потенциалуправляемые K^+-каналы активируются.

В этот момент начинается фаза реполяризации. Ионы K^+ пассивным транспортом выходят из клетки, и возникающий при этом ток ведет к смещению мембранного потенциала в отрицательную область. Фаза реполяризации завершается следовой гиперполяризацией или следовой деполяризацией. Параллельно с потенциалом действия меняется возбудимость клетки, проходя три фазы: повышенной возбудимости, абсолютной и относительной рефрактерности.

При применении терминов «деполяризация» и «реполяризация» возникают определенные проблемы, связанные со значением этих понятий. Если термин «фаза реполяризации» в общем-то применим, поскольку отражает смысл процесса, т.е. представля-

ет собой уменьшение потенциала от какой-либо максимальной точки до уровня потенциала покоя, то возможность использования термина «фаза деполяризации» необходимо оговорить особо. Давайте сначала назовем кривую, отражающую изменение потенциала от уровня потенциала покоя до точки пика, фазой нарастания потенциала действия, а фазу реполяризации — фазой падения потенциала действия, что, может быть, будет воспринято многими читателями не очень позитивно, однако достаточно близко авторам.

В литературе фазой деполяризации называют либо весь фронт нарастания потенциала действия, либо его части: от уровня потенциала покоя до нуля; уровня критического потенциала до точки пика; уровня критического потенциала до нуля.

На самом деле на все это фразеологическое разнообразие можно было бы и не обращать внимание в случае, если авторы оговаривают, какой отрезок фронта нарастания потенциала действия они имеют в виду, если бы не разные механизмы, заложенные в каждой стадии, которую проходит фронт нарастания. Более того, у ряда клеток потенциал действия может и не достигать нуля, а его реализация связана с совершенно иными механизмами. Поэтому если строго определять фазу деполяризации, то это часть фронта нарастания потенциала действия от уровня потенциала покоя до нуля. Происходящая далее реверсия потенциала не может быть названа деполяризацией. Именно поэтому мы в тексте отошли от использования термина «деполяризация мембраны» и применяем в основном термин «фронт нарастания потенциала действия». Это дало нам возможность описать потенциал действия не на основании известных фаз, включающих множество механизмов, а на основании стадий фронта нарастания потенциала действия, каждая из которых определена на основе только одного процесса, ее формирующего.

Если электровозбудимую клетку или нервное волокно подвергнуть действию электрического раздражителя пороговой величины, то возникает возбуждение этого участка, электрофизиологическим выражением которого является потенциал действия. Это возбуждение распространяется по всей мембране и называется *распространяющимся.*

На рис. 6.13 продемонстрированы потенциал действия и его фазы. Он начинается в результате смещения потенциала покоя (например, от −90 мВ) прямоугольным импульсом электрического тока до уровня критического потенциала (разного для разных типов клеток), после чего в результате изменения ионных токов меняется и сам потенциал клетки, быстро нарастая в положительную область и доходя до 0 мВ. Обычно эта фаза называется *фазой деполяризации.* Потенциал действия продолжает возрастать, пересекая 0 мВ и достигая значений, лежащих около +35 мВ (точ-

Рис. 6.13. Потенциал действия нервной клетки и его главные фазы: E_c — критический потенциал

нее, разных значений для разных типов клеток). По достижении пика величина потенциала падает в отрицательную область, вновь достигая 0 мВ. *Превышение потенциала действия над нулевой линией называется* ***овершутом***. Далее потенциал действия пересекает 0 мВ и достигает значений потенциала покоя. Эта фаза обычно называется *фазой реполяризации*.

В процессе реполяризации потенциал действия может возвращаться на уровень потенциала покоя по двум разным ионным механизмам (рис. 6.14). Первый механизм приводит к тому, что от *уровня критического потенциала реполяризация медленно и плавно переходит в потенциал покоя*. Это следовая деполяризация. При втором механизме реполяризация достигает величины потенциа-

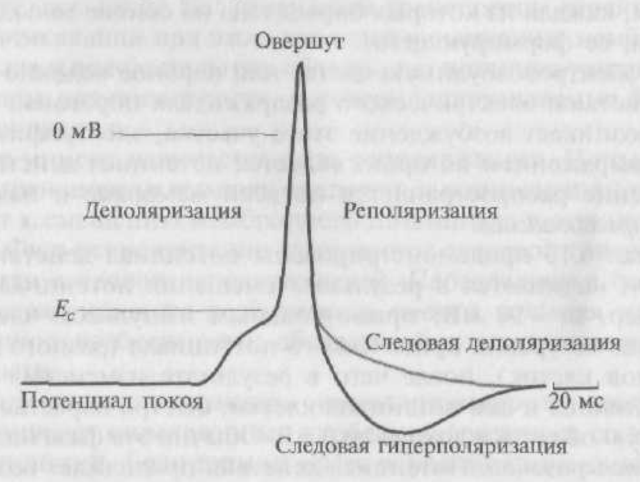


Рис. 6.14. Следовые потенциалы в развитии потенциала действия

ла покоя и продолжается дальше в более отрицательную область, после чего возвращается к уровню потенциала покоя. Это следовая гиперполяризация.

Рассмотрим связь потенциала действия с ионными токами на качественном уровне (рис. 6.15). Мы сознательно упрощаем ситуацию для лучшего понимания вопроса при дальнейшей количественной оценке.

На рис. 6.15, *а* схематично продемонстрирован типичный и наиболее абстрактный потенциал действия, относящийся, скорее, к нервной ткани. Мы искусственно разбили его на ряд стадий, которые так или иначе связаны с изменениями ионных токов, обозначенных цифрами. Обсудим эти изменения, продемонстрированные теми же цифрами на рис. 6.15, *б*.

Стадия *1* представляет собой потенциал покоя, механизм которого обсуждался ранее. Он принципиально сводится к незначительному входу ионов Na^+ в клетку и превышающему его выходу ионов K^+ по каналам утечки. При этом мембрана имеет внутри отрицательный заряд, а снаружи — положительный.

Стадия *2* представляет собой проявление пассивного электротонического потенциала, который определяется только емкостными и резистивными свойствами мембраны и не связан с изменением ионных токов через мембрану. Таким образом, сохраняется незначительный вход ионов Na^+ в клетку (что подчеркивается пунктирной стрелкой) и превышающий его выход ионов K^+ по каналам утечки мембраны. Клетка также имеет внутри отрицательный заряд, а снаружи — положительный.

Стадия *3* связана с локальным ответом, при котором происходит некоторое увеличение входа ионов Na^+ в клетку, но уже через потенциалуправляемые Na^+-каналы (как это обсуждалось в предыдущем подразделе), что на схеме отмечено сплошной стрелкой. Выход ионов K^+ и незначительный вход ионов Na^+ по каналам утечки остается без изменений. На этой стадии клетка имеет внутри отрицательный заряд, а снаружи — положительный.

Стадия *4* начинается в тот момент, когда смещаемый потенциал мембраны достигает критического уровня. Активируются (открываются) все потенциалуправляемые Na^+-каналы (не каналы утечки), и возникает процесс, который называется *активацией входящего Na^+-тока*.

Ионы Na^+ лавинообразно входят в клетку, что ведет к дальнейшему смещению мембранного потенциала, достигающего нуля. Все это время выход ионов K^+ осуществляется только по каналам утечки и остается без изменений. Клетка имеет внутри отрицательный заряд, а снаружи — положительный.

Отдельно рассмотрим стадию *5*, т.е. ситуацию в нуле. В этот момент потенциалуправляемые Na^+-каналы открыты и ионы Na^+ продолжают входить в клетку. Выход ионов K^+, как отмечалось,

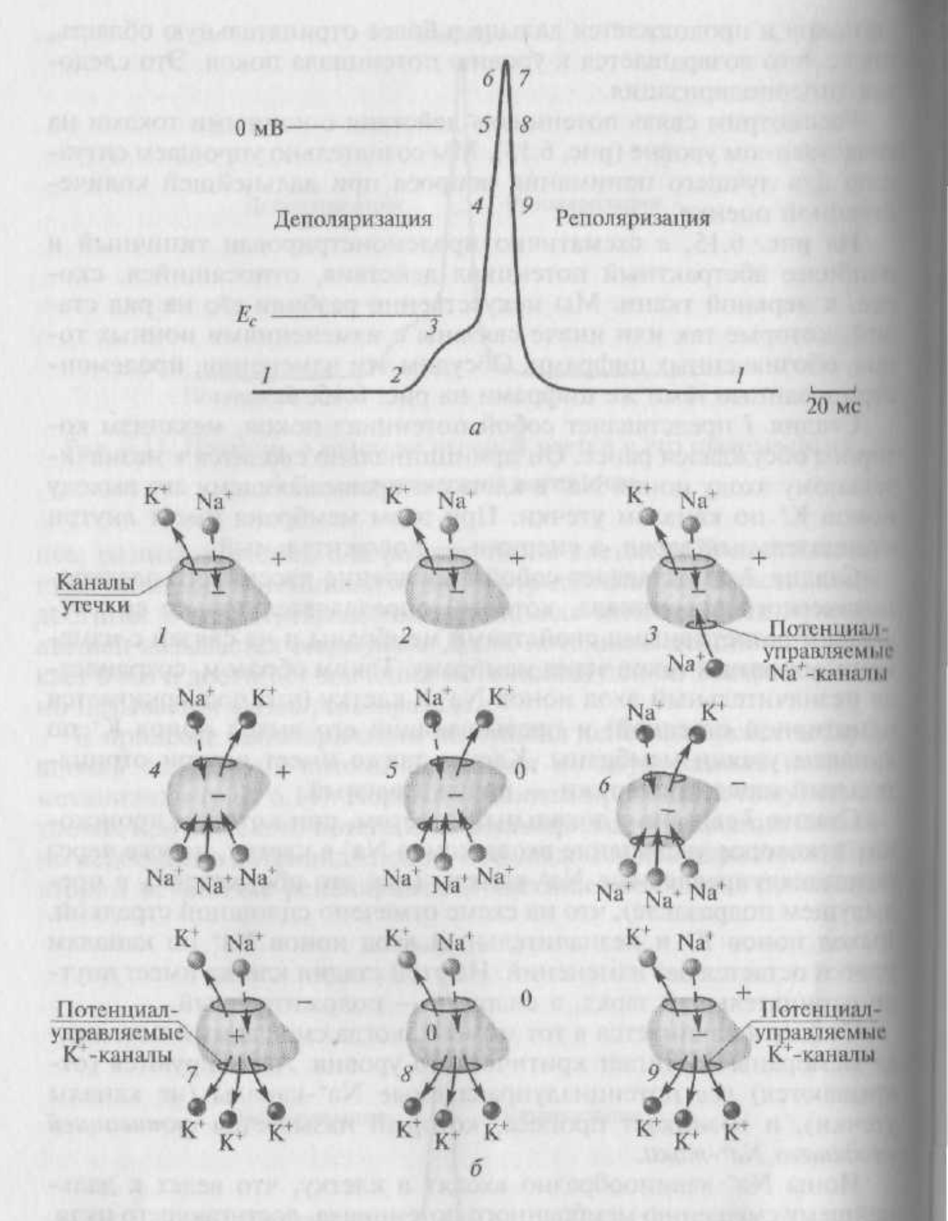


Рис. 6.15. Связь потенциала действия с ионными механизмами на качественном уровне:

а — форма потенциала действия и его основные стадии, выделенные на базе лежащих в их основе механизмов; *б* — ионный механизм потенциала действия; *1* — стадия потенциала покоя; *2* — стадия пассивного электротонического потенциала; *3* — стадия самостоятельного развития локального ответа; *4, 5* — фазы нарастания потенциала действия; *6, 7* — овершут; *8, 9* — реполяризация

остается без изменений. Но в клетку вошло так много ионов Na^+, что внутриклеточный отрицательный заряд скомпенсировался, и мембрана клетки становится электронейтральной. Тем не менее ионы Na^+ продолжают входить в клетку и вносят положительный заряд — стадия *6*. В это время мембрана внутри клетки становится более электроположительной, чем снаружи. Происходит реверсия потенциала, но не реверсия натриевого электрохимического градиента.

Равновесный потенциал для натрия равен +55 мВ. Потенциал смещается в более положительную область и может достигнуть (у определенных клеток) величины, равной +35 мВ. Эта величина потенциала вызывает инактивацию потенциалуправляемых Na^+-каналов и соответственно инактивацию входящего Na^+-тока. Эти же величины потенциала вызывают активацию потенциалуправляемых K^+-каналов и соответственно активацию выходящего K^+-тока. Эти процессы знаменуют начало стадии *7*.

Поток ионов Na^+ в клетку прекращается, но из клетки интенсивно через потенциалуправляемые K^+-каналы выходят ионы K^+. На этой фазе мембрана клетки остается более электроположительной внутри клетки, чем снаружи со стороны внеклеточной среды, хотя потенциал стремится в отрицательную область. В итоге выхода ионов K^+ мембранный потенциал уменьшается до нуля — стадия *8*. Благодаря интенсивному выходу ионов K^+ мембрана клетки вновь стала электронейтральной.

Далее начинается стадия *9*, при которой выход ионов K^+ приводит к тому, что потенциал клетки вновь приобретает электроотрицательность по отношению к внешней среде. Это продолжается до достижения потенциала покоя, величина которого приводит к закрытию K^+-каналов и инактивации выходящего K^+-тока. Клетка возвращается в исходное состояние.

Необходимо отметить, что сейчас мы даем лишь упрощенную трактовку происходящего в клетке. Это необходимо для общего понимания вопроса читателями, которые мало знакомы с проблемой.

6.6.2. Типы биоэлектрической активности на примере нервных клеток

Рассмотрим типы биоэлектрической активности только нервных клеток (рис. 6.16), поскольку данные об этом для клеток других тканей (например, миокардиальной или мышечной) изложены в соответствующих подразделах. Ранее мы рассматривали потенциал действия, вызванный искусственной внутриклеточной деполяризацией. Он возникал у клеток с неменяющимся потенциалом покоя. Такие клетки, которые самостоятельно не генерируют

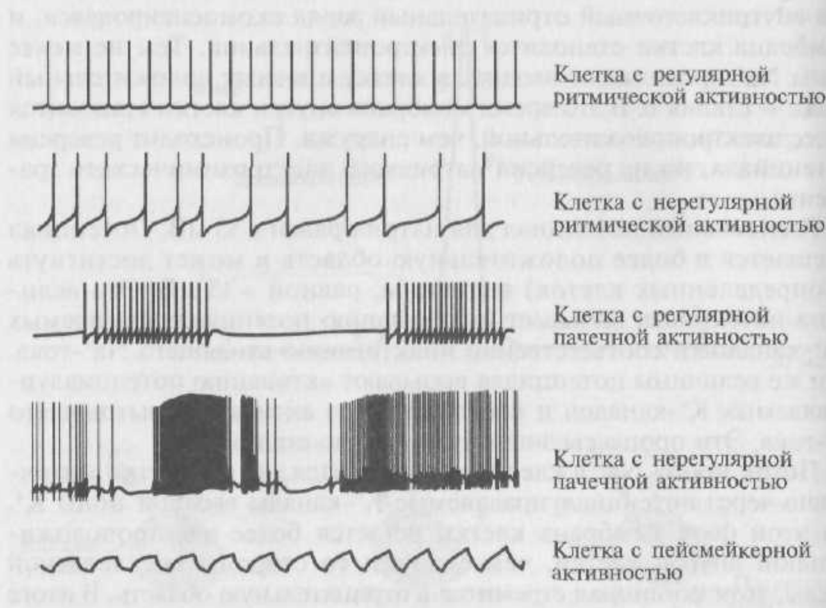


Рис. 6.16. Типы биоэлектрической активности нервных клеток

потенциалы действия, называются *молчащими* (см. рис. 6.16). Это первый тип биоэлектрической активности нейронов.

Ко второму типу биоэлектрической активности клеток относятся нейроны, способные самостоятельно генерировать потенциалы действия. Механизмы этой генерации рассмотрим в следующих главах, а сейчас обратимся исключительно к феноменологической стороне вопроса.

Ко второму типу относятся клетки, генерирующие регулярную ритмическую активность (см. рис. 6.16), нерегулярную ритмическую активность (см. рис. 6.16) и регулярную пачечную (несколько потенциалов действия — пачка, после чего наблюдается короткий период покоя) активность. При этом количество потенциалов действия в пачке и межпачечные интервалы одинаковые (см. рис. 6.16). Наконец, это клетки, генерирующие нерегулярную пачечную активность. При этом количество потенциалов действия в пачке, частота их возникновения и межпачечные интервалы разные (см. рис. 6.16).

К третьему типу биоэлектрической активности клеток относятся нейроны, способные самостоятельно генерировать флуктуации потенциала покоя, не достигающие критического потенциала (см. рис. 6.16). Обычно эти флуктуации бывают синусоидальной или пилообразной формы. Только редкие осцилляции могут достигнуть порога и вызвать генерацию одиночных потенциалов

действия. Этот тип потенциалов называется *пейсмекерным*. К сожалению, как в отечественной, так и в зарубежной литературе этот термин несет две смысловые нагрузки. Во-первых, пейсмекерными называются клетки, генерирующие истинный пейсмейкерный потенциал, показанный на рис. 6.16. Во-вторых, так называют клетки, способные к самостоятельной генерации потенциалов действия. В таком смысле этот термин особенно прижился в терминологии по электрофизиологии сердца, с чем читателю придется столкнуться далее.

6.6.3. Влияние коротко длящейся поляризации на биоэлектрическую активность клеток

Как отмечалось ранее, к числу основных раздражителей клеток принадлежит электрический ток. Электровозбудимые ткани в ответ на действие электрического раздражителя отвечают процессом возбуждения, первым компонентом которого является генерация потенциала действия, однако чтобы возбуждение возникло, необходимо соблюсти ряд условий. Большое количество работ было посвящено детальному изучению законов электрического раздражения. Их цель заключалась в том, чтобы выяснить, какого рода электрические импульсы наиболее эффективны в качестве раздражителей и каковы характерные различия в электровозбудимости нервных и мышечных волокон разного типа. В результате было показано, что для возникновения процесса возбуждения важны: порог раздражения, время действия раздражителя и скорость нарастания раздражителя.

Для начала введем определенные обозначения. Обозначение E_m используется только для мембранного потенциала в состоянии покоя клетки. Обозначение V_m используется для любых мембранных потенциалов — и в состоянии покоя, и при активности, а ΔV_m означает любое изменение мембранного потенциала.

Если на мембрану клетки воздействовать импульсами электрического тока либо положительной, либо отрицательной полярности, то это воздействие вызовет смещение мембранного потенциала E_m соответственно либо в положительную (деполяризация мембраны), либо в отрицательную область (гиперполяризация мембраны).

На рис. 6.17 показано влияние прямоугольных импульсов электрического тока различной силы и полярности на мембранный потенциал E_m. Условием возникновения возбуждения, или потенциала действия, в клетке или нервном волокне является величина критической деполяризации, или критический потенциал (E_c) электровозбудимой мембраны. Далее будет показано, что электрическое раздражение вызывает быстрое смещение мемб-

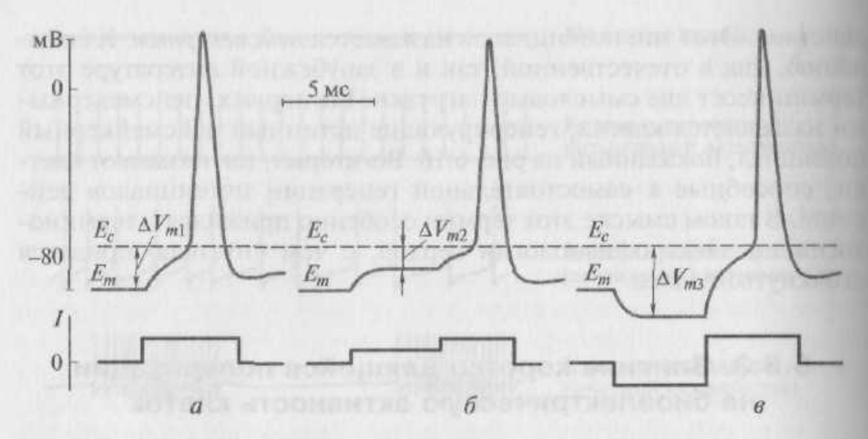


Рис. 6.17. Соотношения между исходным уровнем потенциала покоя (E_m), критическим уровнем деполяризации (E_c) и пороговым потенциалом (ΔV_m):

а — в норме; *б* — при деполяризации; *в* — при гиперполяризации

ранного потенциала клеточной мембраны до уровня E_c, при котором происходит активация потенциалуправляемых Na^+-каналов, что и приводит к возбуждению мембраны в виде потенциала действия.

Если исходный уровень потенциала покоя обозначать E_m, а критическую величину, до которой этот потенциал должен быть сдвинут в сторону 0 мВ для возникновения потенциала действия, как E_c, то тогда можно ввести понятие «пороговый сдвиг мембранного потенциала», или «пороговый потенциал» ΔV_m, и связать эти три величины следующим выражением:

$$E_m + \Delta V_m = E_c$$

или

$$\Delta V_m = E_c - E_m.$$

На рис. 6.17, *а* показан прямоугольный импульс электрического тока положительной полярности, вызывающий смещение мембранного потенциала до величины E_c, что приводит к возникновению потенциала действия. В этом случае величина порогового потенциала будет равна ΔV_{m1}.

На рис. 6.17, *б* показан ступенчатый прямоугольный импульс электрического тока положительной полярности, причем первая ступень, смещая E_m в более положительную область, не вызывает смещение мембранного потенциала до величины E_c, поэтому на фоне первой ступени потенциал действия не возникает. Но в этом случае величина порогового потенциала будет меньше, чем ΔV_{m1},

и равна ΔV_{m2}. Вторая ступень вызывает смещение мембранного потенциала до величины E_c, что и приводит к возникновению потенциала действия.

На рис. 6.17, *в* также показан ступенчатый прямоугольный импульс электрического тока, но его первая ступень имеет отрицательную полярность, а вторая ступень — положительную. Первая ступень смещает E_m в более отрицательную область. На фоне этой первой ступени потенциал действия не возникает, и в этом случае величина порогового потенциала будет больше, чем ΔV_{m1}, и равна ΔV_{m3}. Вторая ступень вызывает смещение мембранного потенциала до величины E_c, что и приводит к возникновению потенциала действия.

Таким образом, из рисунка следует, что чем меньше разница между E_m и E_c, тем меньше пороговый потенциал и, следовательно, тем выше возбудимость ткани. Наоборот, чем больше разница между E_m и E_c, тем больше пороговый потенциал и тем меньше возбудимость ткани. Таким образом, минимальный сдвиг потенциала покоя, необходимый для того, чтобы E_m достиг критической величины E_c, и называют ***пороговым потенциалом.*** Точное измерение его абсолютной величины возможно только в опытах на одиночных клетках.

На рис. 6.18 продемонстрирована более сложная ситуация. Если клетку с мембранным потенциалом, равным −80 мВ, поляризовать импульсами электрического тока отрицательной полярности, увеличивая их амплитуду, то ответы клетки проявятся в виде смещений мембранного потенциала, расположенных в более отрицательной, чем потенциал покоя, области (гиперполяризация мембраны).

Если мембрану клетки поляризовать импульсами электрического тока положительной полярности, увеличивая их амплитуду, то ответы клетки проявятся в виде смещений мембранного потенциала в более положительную область (деполяризация мембраны). При этом если величина смещенного мембранного потенциала не будет достигать критического потенциала и если даже смещенный мембранный потенциал будет достигать величины критического потенциала лишь на короткое время (кривая *1*), то все эти ответы клетки будут расположены в подпороговой области. Если же величина раздражающего импульса электрического тока доходит до критического потенциала, то возникает потенциал действия (первый на рисунке). А если смещенный мембранный потенциал достигнет критического потенциала и будет длиться какое-то время (кривая *2*), то также может возникать потенциал действия (второй на рисунке).

Из этих экспериментов был сделан вывод, что не только сила раздражителя, но и его длительность важны для возникновения потенциала действия.

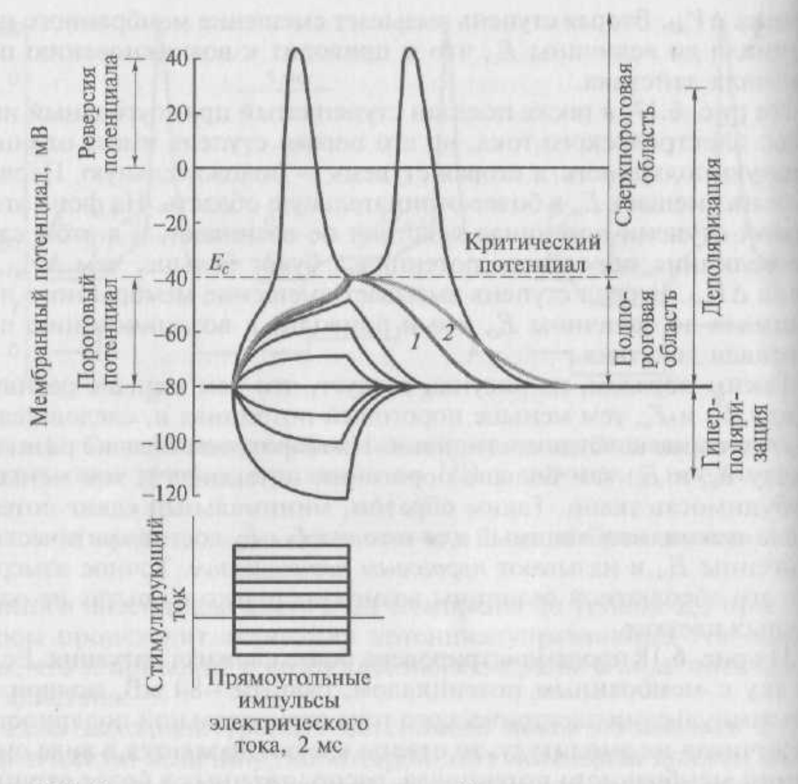


Рис. 6.18. Возникновение потенциала действия как результат критической деполяризации мембраны. Показаны смещения мембранного потенциала клетки, возникающие при ступенчатом изменении величины поляризующего тока, от потенциала покоя (–80 мВ) в более отрицательную область (гиперполяризация мембраны до –120 мВ) и в более положительную область (деполяризации мембраны до –40 мВ). Величина –40 мВ (пунктирная линяя) является критической деполяризацией, при достижении которой возникает потенциал действия. Внизу показаны прямоугольные импульсы электрического тока положительной и отрицательной полярности, действующие на клетку

Сама клеточная мембрана ведет себя как конденсатор с утечкой (напомним, что любой конденсатор со временем разряжается), постоянная времени которого определяется его собственными сопротивлением и емкостью. Для того чтобы короткий импульс электрического тока мог изменить потенциал мембраны, через нее должно пройти некоторое минимальное количество электричества (измеряемое произведением силы тока на время). По мере сокращения длительности импульса необходимо увеличивать силу тока, чтобы он сохранял свою эффективность в качестве раздражителя.

Еще одно свойство электровозбудимых клеток состоит в том, что они рано или поздно адаптируются к изменению, вызванному раздражителем. В случае электрического раздражения это значит, что постоянный электрический ток вначале эффективен, но в дальнейшем утрачивает свою действенность. Этот вопрос и его механизм будут рассматриваться далее.

Электрический ток, сила которого возрастает медленно, также может не вызвать возбуждения, даже если он постепенно достигнет величины, во много раз превышающей ту, при которой прямоугольный импульс уже эффективен. По этой же причине неэффективен синусоидальный переменный ток очень низкой частоты: скорость изменения силы тока при этом слишком мала. Переменный ток очень высокой частоты тоже не вызывает возбуждения, так как его полупериоды слишком коротки для того, чтобы изменить мембранный потенциал (на конденсаторе, который в данном случае является фильтром высоких частот). Самой эффективной, а потому и самой опасной формой электрического раздражения является воздействие бытового и переменного тока, т.е. синусоидальных волн с частотой 50—60 Гц.

6.6.4. Влияние долго длящейся поляризации на биоэлектрическую активность клеток

Нервные клетки на своей поверхности имеют огромное количество синапсов. Они подвержены воздействию достаточно долго длящейся деполяризации или гиперполяризации, возникающих на постсинаптической мембране в результате синаптического влияния, поэтому анализ долго длящейся поляризации на биоэлектрическую активность клеток имеет важное значение для понимания многих процессов «поведения» отдельных клеток и их межклеточного взаимодействия.

Большинство нервных клеток на стимуляцию постоянным деполяризующим электрическим током отвечает ритмическими разрядами потенциалов действия, и наоборот, аппликация постоянного гиперполяризующего электрического тока ингибирует возникновение потенциалов действия. Исследование этих процессов, как отмечалось, представляет значительный интерес, поскольку они моделируют активацию или ингибирование ритмических разрядов клеток в естественных условиях при действии трансмиттеров.

Рассмотрим сначала влияние деполяризующего тока, продемонстрированное на рис. 6.19, *а*. Как было показано ранее, клетка отвечает генерацией потенциала действия на пороговый импульс раздражающего тока. Почему же на длительный деполяризующий импульс электрического тока возникает только один потенциал

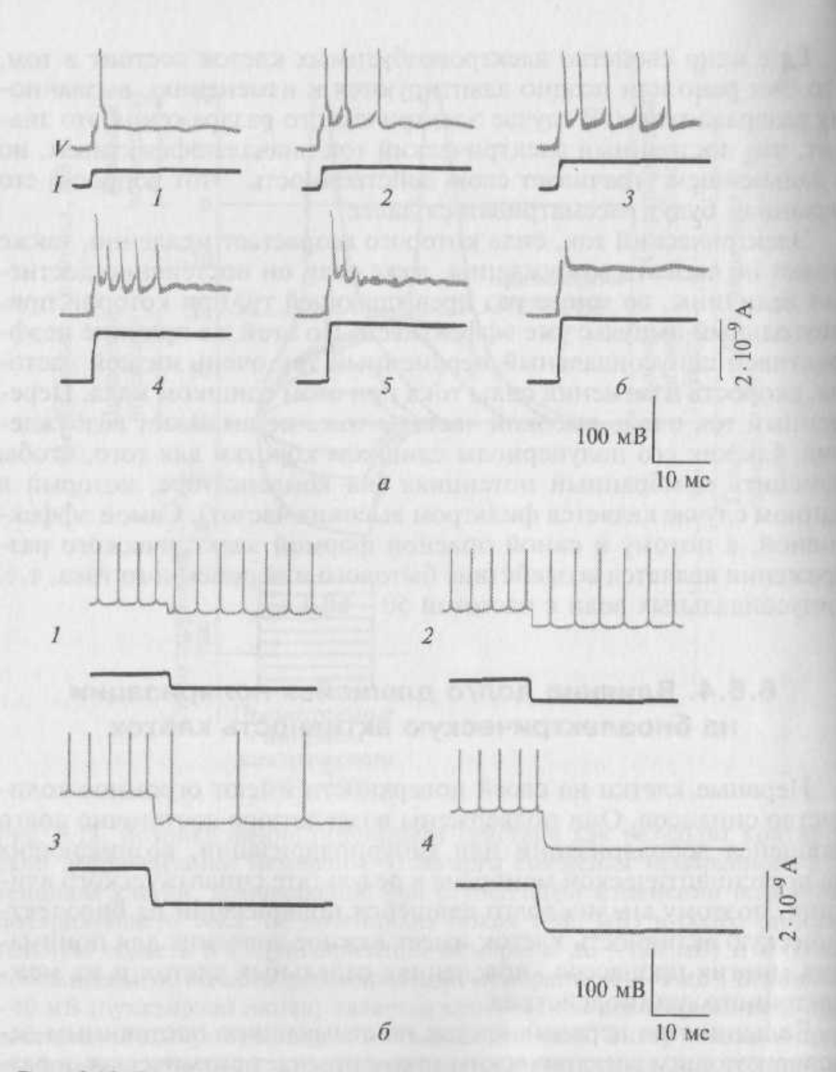


Рис. 6.19. Влияние на биоэлектрическую активность нервной клетки:
а — искуственной долго длящейся деполяризации; *б* — гиперполяризации различной силы

действия (рис. 6.19, *а1*)? Дело в том, что порог для возникновения повторного ответа выше, чем для генерации одиночного потенциала действия. Основа механизма этого процесса в том, что после окончания первого потенциала действия сопротивление мембраны обычно снижено за счет высокой проводимости для ионов K^+, поэтому раздражающий ток из порогового превращается в подпороговый. Кроме того, продолжающаяся деполяризация препятствует полному устранению инактивации Na^+-каналов. Если

эти изменения небольшие, они могут быть скомпенсированы увеличением силы тока раздражающего импульса (рис. 6.19, *а2*), что приведет к появлению нескольких потенциалов действия. Еще большее повышение силы тока приведет к генерации ритмической активности (рис. 6.19, *а3*). Дальнейшее дискретное увеличение силы деполяризующего тока до определенного предела приведет к учащению ритмического разряда и увеличению числа импульсов в нем (не показано).

Однако при дальнейшем увеличении силы деполяризующего тока разряд потенциалов действия укорачивается и уменьшается по амплитуде (рис. 6.19, *а4* и *5*) вплоть до полного прекращения генерации потенциалов действия (рис. 6.19, *а6*). Причиной этого является инактивация Na^+-каналов.

Если исходно исследовалась клетка, генерирующая потенциалы действия, то во всех случаях после прекращения длительной деполяризации наблюдается период постактивационного торможения, при котором клетка не генерирует потенциалы действия самопроизвольно.

Время постактивационного торможения тем больше, чем больше была амплитуда стимулирующего тока. После этого клетка постепенно восстанавливает свой ритм.

Влияние длительного гиперполяризующего тока, продемонстрированное на рис. 6.19, *б*, обычно рассматривается применительно к нейронам, обладающим спонтанной активностью (т.е. возможностью самопроизвольно генерировать потенциалы действия). Увеличение гиперполяризации клетки (рис. 6.19, *б1—3*) приводит к уменьшению частоты спайковой активности и увеличению амплитуды потенциалов действия за счет удаления от величины критического потенциала вплоть до полного прекращения генерации этих потенциалов (рис. 6.19, *б4*).

Во всех случаях после прекращения длительной гиперполяризации наблюдается период постгормозной активации, при котором клетка с более высокой частотой, чем исходная, самопроизвольно генерирует потенциалы действия. Время посттормозной активации тем больше, чем больше была величина гиперполяризующего тока. После этого клетка постепенно восстанавливает свой ритм.

Эти и другие механизмы, связанные с самопроизвольной генерацией потенциалов действия, станут более понятными после рассмотрения вопросов, связанных с ионными токами через мембрану.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Камкин А. Г. Техническое обеспечение микроэлектродного исследования клеток / А. Г. Камкин, И. С. Киселева. — М., 1989.

Fatt P. An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode / P. Fatt, B. Katz // J. Physiol. — 1951. — V. 115. — P. 320 — 370.

Ling G. The normal membrane potential of frog sartorius fibers / G. Ling, R. W. Gerard // J. Cell. Comp. Physiol. — 1949. — V. 34. — P. 383 — 396.

Nastuk W. L. Membrane potential changes at a single muscle end-plate produced by transitory application of acetylcholine with an electrically controlled microjet // Fend. Proc. Fend. Am. Socs. Exp. Biol. — 1953. — V. 12. — P. 102.

Nastuk W. L. The electrical activity of single muscle fibres / W. L. Nastuk, A. L. Hodgkin // J. Cell. Comp. Physiol. — 1950. — V. 35. — P. 39 — 73.

Purves R. D. Microelectrode Methods for Intracellular Recording and Ionophoresis / R. D. Purves. — Academic Press. A Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, 1981.

ГЛАВА 7

ИОННЫЕ ТОКИ

7.1. Фиксация потенциала у аксонов

Современные представления о механизмах генерации потенциала действия сформировались на основе результатов уникальных исследований, проведенных на гигантском аксоне кальмара. Его диаметр обычно равен 1 мм, а длина достигает 10 см. Это позволило А.Л.Ходжкину, А.Ф.Хаксли (A.F.Huxley) и Б.Катцу в середине прошлого столетия выполнить весьма специфические и крайне сложные эксперименты, которые в те времена не могли быть поставлены на самих клетках.

Известно, что электрическое состояние мембраны можно описать обыкновенным дифференциальным уравнением для общего тока, текущего в покое через мембрану:

$$I_m = \frac{V_m - V_{\text{покоя}}}{R_m} + C_m \frac{\mathrm{d}V_m}{\mathrm{d}t} = g_m \Delta V_m + C_m \frac{\mathrm{d}V_m}{\mathrm{d}t}.$$

Однако это выражение можно представить и так:

$$I_m = I_i + C_m \frac{\mathrm{d}V_m}{\mathrm{d}t}, \quad (7.1)$$

где I_i — трансмембранный ионный ток, который становится простой функцией проводимости мембраны (g_m) и напряжения (ΔV_m).

Если, основываясь на этом уравнении, к мембране подключить измеритель потенциала с высоким входным сопротивлением, то суммарный ток через мембрану $I_m = 0$. В этом случае, как следует из уравнения (7.1), дифференцируя амплитуду нервного импульса по времени, можно измерить ионный ток, протекающий при электрическом возбуждении следующим образом:

$$I_i = C_m \frac{\mathrm{d}V_m}{\mathrm{d}t}.$$

Однако такой метод не позволяет разделить и количественно описать различные компоненты ионной проводимости, участвующие в генерации потенциала действия.

Принципиальный вклад в решение этих задач внес К. Коул (K. Cole, 1949), разработавший метод введения в волокно электрода, служившего как для измерений мембранного потенциала, так и для подачи импульсов стимулирующего тока. Как это часто бывает, К. Коул не оценил возможных перспектив разработанного им метода. Усовершенствовали эту методику А. Л. Ходжкин, А. Ф. Хаксли и Б. Катц, которые назвали ее *методом фиксации потенциала* (voltage clamp). Авторы ввели в волокно вдоль оси два электрода, один из которых служил для регистрации мембранного потенциала, а второй — для подачи импульсов стимулирующего тока; спустя только 3 года авторы опубликовали серию статей, ставших теперь классическими. При помощи этого метода в дальнейшем было получено огромное количество экспериментальных данных.

В целом метод основывался на том, что в известном выражении (7.1) емкостный ток становится равным нулю, если V_m задать равным константе. При этом I_m становится равным I_i, т. е. ионный ток оказывается выведенным во внешнюю измерительную цепь.

Технически это достигалось достаточно просто. К мембране подключали управляемый источник напряжения, способный за короткое время изменить мембранный потенциал до нового заданного постоянного значения (быстро перезарядить мембранную емкость). Как только достигалось это фиксированное значение, емкостный ток $C_m \frac{dV_m}{dt}$ становится равным нулю, а I_m равным I_i.

Метод фиксации потенциала позволяет зарегистрировать ионные токи, разделить на компоненты и измерить вольт-амперные характеристики отдельных элементов ионной проводимости мембраны.

Техническая сторона метода представлена в виде схемы на рис. 7.1. Электроды *C* и *D* связаны с входом усилителя напряжения, и соединенный с ним осциллограф регистрирует мембранный потенциал. С помощью электронной схемы с обратной связью этот потенциал можно длительное время фиксировать (или поддерживать) на любом уровне путем пропускания тока необходимой величины между электродами *A* и *B*, поэтому он называется *поддерживаемым потенциалом* (holding potential). При помощи генератора прямоугольных импульсов электрического тока на участке мембраны его можно смещать до некоторой новой величины и удерживать на этом уровне также с помощью электронной схемы с обратной связью. Ток, протекающий через этот участок мембраны при поддерживаемом потенциале или под влиянием при-

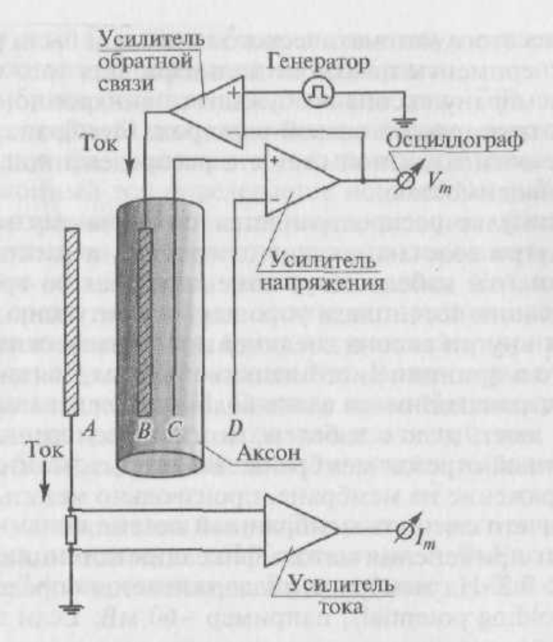


Рис. 7.1. Схема метода фиксации потенциала применительно к аксону кальмара. Мембранный потенциал (V_m) регистрируется между электродами *C* и *D* и подается на усилитель потенциала, связанный с осциллографом. С помощью электронной схемы с обратной связью он поддерживается на необходимом экспериментатору уровне путем пропускания тока между электродами *A* и *B*. При помощи генератора прямоугольных импульсов электрического тока поддерживаемый потенциал можно смещать до некоторой новой величины и удерживать на этом уровне также с помощью электронной схемы с обратной связью. Ток (I_m), протекающий через этот участок мембраны при поддерживаемом потенциале или под влиянием приложенного напряжения, измеряют отдельным усилителем тока, *также связанным с измерительным прибором*

ложенного напряжения, измеряют отдельным усилителем тока, который также подсоединен к осциллографу. Эта характерная для экспериментов на аксонах схема используется и в настоящее время. Именно с ее помощью А.Л. Ходжкин, А.Ф. Хаксли и Б. Катц описали ионные токи гигантского аксона кальмара, а затем Б. Франкенхаузер (B. Frankenhaeuser) применил этот метод к перехвату Ранвье, обнаружив некоторые несущественные отличия его токов по сравнению с токами у гигантских аксонов.

До введения этого метода анализ процесса электрического возбуждения в нервных волокнах упирался в вопрос о распространении возбуждения по волокну. Любая попытка количественно описать его приводила к необходимости решать кабельные уравнения в частных производных.

Исходя из этого математического подхода и были разработаны первые эксперименты на аксоне кальмара. Для того чтобы заставить всю мембрану аксона возбуждаться синхронно, внутрь него был введен проводящий осевой электрод. Мембрана представлялась в виде эквивалентной схемы с распределенной емкостью и ионной проводимостью.

Когда импульс распространяется по нервному волокну, потенциал внутри волокна зависит от времени и расстояния, и через все элементы кабеля текут изменяющиеся во времени токи. Метод фиксации потенциала упрощает эту ситуацию. Во-первых, все участки внутри аксона соединены металлическим проводником, так что в принципе нет никаких проблем, связанных с токами, распространяющимися вдоль волокна. Следовательно, вместо того чтобы иметь дело с кабелем, можно рассматривать нерв как изолированный отрезок мембраны. Во-вторых, можно контролировать напряжение на мембране, произвольно менять его величину и ступенчато смещать мембранный потенциал.

Результат применения метода фиксации потенциала представлен на рис. 7.2. На мембране поддерживается определенный потенциал (holding potential), например –60 мВ. Если при помощи прямоугольного импульса электрического тока сместить мембранный потенциал (деполяризовать мембрану) до 0 мВ, то в зарегистрированном токе можно различить три отдельные фазы. Вначале наблюдается так называемый емкостный ток, т. е. мгновенный пик тока, направленного наружу, который обусловлен разрядом мембранной емкости. Поскольку она оказывается полностью разряженной, последующий ток определяют ионы, проходящие через ионные каналы. Вторая фаза представляет собой ток, направленный внутрь клетки (входящий ток I_{in}), т. е. вход катионов в цитозоль через ионные каналы мембраны. Эта фаза относительно кратковременна и переходит в третью фазу тока, который течет из клетки

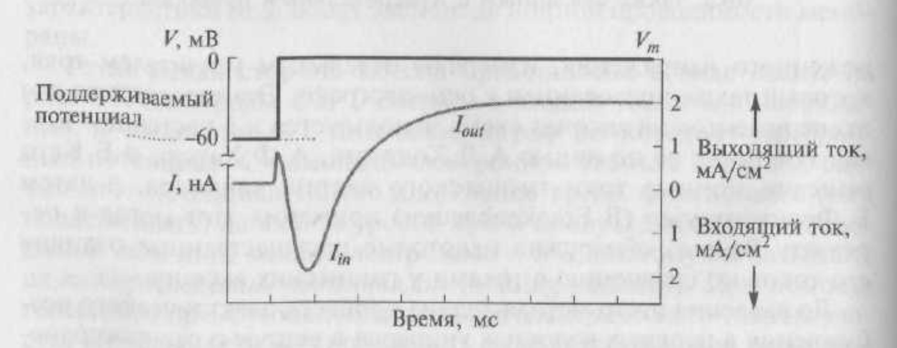


Рис. 7.2. Ток, протекающий через мембрану (нижняя кривая), при смещении потенциала до 0 мВ относительно поддерживаемого потенциала, равного –60 мВ (верхняя кривая)

(выходящий ток I_{out}) до тех пор, пока импульс электрического тока поддерживает деполяризацию мембраны.

Если мембрана резко деполяризована (рис. 7.3), общий ионный ток (т. е. текущий после почти мгновенного разряда емкости) состоит из двух фаз: входящего и выходящего токов (кривая *1*). Поскольку ионный ток определяется ионами Na^+ и K^+ и зависит от их концентраций, то изменяя концентрацию этих ионов, его можно разделить на компоненты, как это показано и описано на рис. 7.3. Было установлено, что если все ионы Na^+, находящиеся во внешней среде, заменить на холин, который не проходит через мембрану, то входящий ток будет отсутствовать (кривая *2*). Следовательно, он обусловлен ионами Na^+. В этом случае выходящий ток приписывался ионам K^+. Сначала ионы Na^+ движутся по концентрационному градиенту, создавая входящий ток, однако эта компонента быстро уменьшается и сменяется выходящим K^+-током.

Для понимания механизма удобно рассмотреть электрическую модель аксона, описанную А. Л. Ходжкиным, А. Ф. Хаксли и Б. Катцом. На рис. 7.4 сопротивление *R* представляет собой сопротивле-

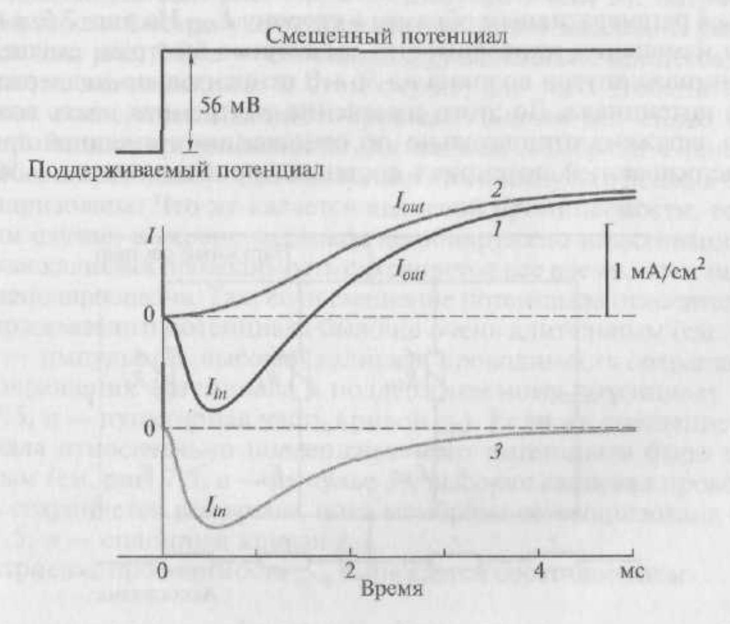


Рис. 7.3. Разделение мембранного тока (I_m) на калиевый и натриевый компоненты:

1 — аксон находится в физиологическом растворе, $I = I_{Na} + I_K$; *2* — натрий заменен на холин, $I = I_K$; *3* — разность между *1* и *2*, $I = I_{Na}$; отклонение кривой вниз соответствует входящему току, а вверх — выходящему току. Поддерживаемый потенциал мембраны клетки и его смещение обозначены сверху

ние осевого электрода, который связывает разные участки мембраны. Предположим, что моделируемый аксон находится в большом объеме раствора, так что наружная жидкость эквипотенциальна и на схеме может быть представлена проводником без сопротивления. На рис. 7.4 показан один элемент мембраны, а следует представить себе большое число аналогичных элементов, связанных между собой и образующих непрерывный кабель. Каждый элемент содержит емкость мембраны *C*, калиевую и натриевую батареи E_K и E_{Na} и сопротивления R_K и R_{Na}. Сопротивление утечки R_l и батарея E_l введены для учета движения ионов, проходящих по каналам, которые не изменяются во время активности, однако ток утечки мал, и в первом приближении его можно не принимать во внимание.

Зная величину калиевого и натриевого тока, нетрудно оценить проводимость мембраны для каждого иона. При подпороговых значениях деполяризации выходящий калиевый ток больше входящего натриевого, что препятствует достижению мембранным потенциалом порога.

Как только входящий Na^+-ток хотя бы слегка превысит выходящий K^+-ток, мембранный потенциал неизбежно начнет смещаться регенеративным образом в сторону E_{Na}. На рис. 7.5, *а* показаны изменения проводимости, вызванные быстрым смещением потенциала внутри волокна на 56 мВ относительно поддерживаемого потенциала. До этого изменения внутренняя часть волокна была заряжена отрицательно по отношению к внешней среде и поддерживаемый потенциал составлял приблизительно –56 мВ.

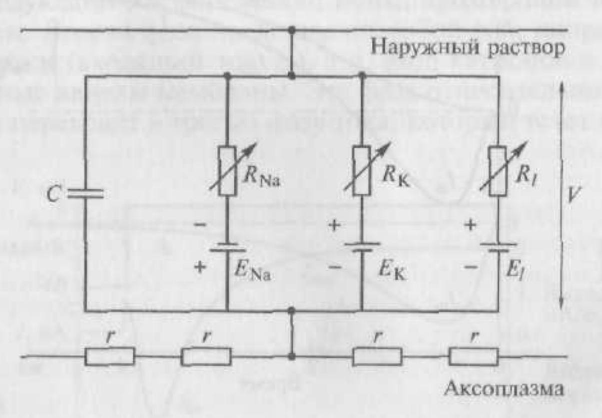


Рис. 7.4. Эквивалентная электрическая схема элемента возбудимой мембраны аксона:

r — сопротивление осевого электрода, введенного в аксон; *C* — емкость мембраны; E_K — калиевая батарея; R_K — сопротивление K^+-канала; E_{Na} — натриевая батарея; R_{Na} — сопротивление Na^+-канала; R_l — сопротивление утечки; E_l — батарея утечки

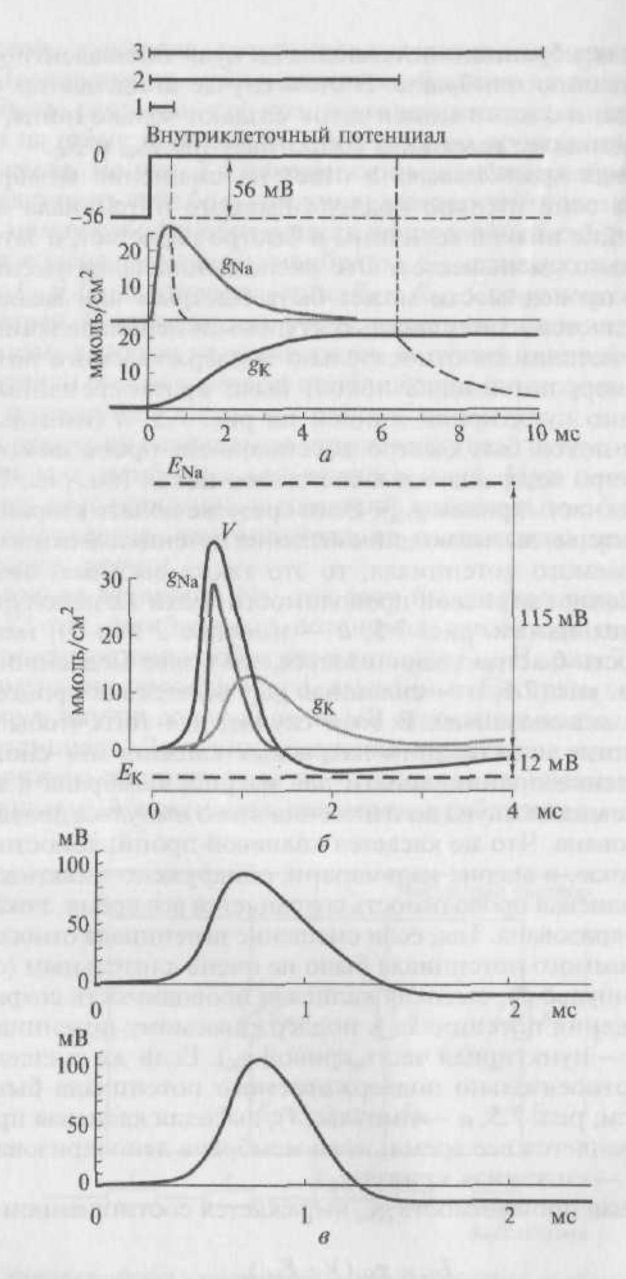
Смещение мембранного потенциала до нуля эквивалентно короткому замыканию мембраны. В этом случае конденсатор *C* сразу разряжается, и с этого момента ток создают только ионы, проходящие по каналам, имеющим сопротивление R_{Na} и R_K.

Натриевая проводимость в ответ на смещение мембранного потенциала относительно поддерживаемого потенциала изменяется от крайне низкой величины и быстро нарастает, а затем экспоненциально уменьшается. Это экспоненциальное уменьшение натриевой проводимости может быть быстрым или медленным, что определяется длительностью ступеньки деполяризации. Если смещение потенциала относительно поддерживаемого потенциала (например, потенциала покоя) было кратковременным, как это показано пунктирной линией на рис. 7.5, *а* (импульс *1*), и потенциал покоя был быстро восстановлен, проницаемость для натрия быстро возвращается к состоянию покоя (см. рис. 7.5, *а* — пунктирная часть кривой g_{Na}). Если сразу же подать второй аналогичный импульс, вызывающий смещение потенциала относительно поддерживаемого потенциала, то это также вызывает аналогичное увеличение натриевой проводимости. Если же деполяризация продолжительна (см. рис. 7.5, *а* — импульс *2* или *3*), натриевая проводимость быстро увеличивается, но более медленно уменьшается (см. рис. 7.5, *а* — сплошная g_{Na}) вследствие процесса, называемого *инактивацией*. В этом случае, для того чтобы второй импульс после инактивации натриевых каналов мог снова вызвать изменение проницаемости для натрия, мембрана в течение нескольких миллисекунд до нанесения этого импульса должна быть реполяризована. Что же касается калиевой проницаемости, то, во всяком случае, в аксоне кальмара не обнаружено инактивации, и высокая калиевая проводимость сохраняется все время, пока мембрана деполяризована. Так, если смещение потенциала относительно поддерживаемого потенциала было не очень длительным (см. рис. 7.5, *а* — импульс *2*), высокая калиевая проводимость сохраняется до возвращения потенциала к поддерживаемому потенциалу (см. рис. 7.5, *а* — пунктирная часть кривой g_K). Если же смещение потенциала относительно поддерживаемого потенциала было длительным (см. рис. 7.5, *а* — импульс *3*), высокая калиевая проводимость сохраняется все время, пока мембрана деполяризована (см. рис. 7.5, *а* — сплошная кривая g_K).

Натриевая проводимость g_{Na} выражается соотношением

$$I_{Na} = g_{Na}(V - E_{Na}), \tag{7.2}$$

где I_{Na} — часть суммарного тока, обусловленная движением ионов натрия; V — мембранный потенциал; E_{Na} — равновесный потенциал для ионов натрия, при котором нет преимущественного направления для движения Na^+ через мембрану.



Уравнение (7.2) является определением g_{Na} и применяется при любом соотношении между I_{Na} и $V - E_{Na}$. Однако после того как было установлено, что в аксоне кальмара в нормальной ионной среде мгновенное значение натриевого тока прямо пропорционально движущей силе $V - E_{Na}$, значение этого уравнения сильно

Рис. 7.5. Натриевая и калиевая проводимости и теоретическая реконструкция потенциала действия:

а — изменения во времени g_{Na} и g_K при деполяризации на 56 мВ, т. е. от поддерживаемого потенциала, равного –56 мВ, до 0 мВ. Поддерживаемый потенциал мембраны клетки и его смещение представлены в верхней части рисунка. Сплошными линиями обозначена продолжительная деполяризация и изменения g_{Na} и g_K в этом случае; пунктирными линиями показаны изменения g_{Na} и g_K в ответ на более короткие ступени их деполяризации; *б* — рассчитанные изменения g_{Na} и g_K при развитии потенциала действия (V); *в* — сравнение рассчитанного потенциала действия (верхний график) с реальным потенциалом действия, зарегистрированным в гигантском аксоне кальмара (нижний график). Рассчитанная скорость проведения потенциала действия составляла 18,8 м/с, а полученная в эксперименте — 21,2 м/с

возросло. Слово «мгновенное» здесь весьма существенно, так как после изменения мембранного потенциала проводимость меняется до новой величины, и ток пропорционален напряжению только в том случае, когда интервал времени между двумя измерениями g_{Na} ничтожно мал.

Калиевая проводимость нарастает от небольшой, но вполне определенной величины. Это изменение начинается не сразу. Кривая увеличения калиевой проводимости имеет S-образную форму, и проводимость достигает постоянного уровня через 5—6 мс. Задержанный сдвиг g_K достигает максимума, и это начинает возвращать мембранный потенциал к уровню потенциала покоя (а часто сдвигает его и несколько дальше этого уровня). Кроме того, приходит в действие другой независимый механизм: деполяризация мембраны вызывает также (с задержкой) инактивацию натриевой проводимости, что тоже способствует возвращению мембранного потенциала к уровню потенциала покоя.

Таким образом, деполяризация гигантского аксона кальмара запускает три процесса:

1) быстрое нарастание g_{Na};

2) задержанное нарастание калиевой проводимости, которая не инактивируется (но выключается при реполяризации мембраны);

3) задержанную инактивацию g_{Na} (см. рис. 7.5).

Изменения проницаемости мембраны для калия и натрия градуальны (т. е. происходят постепенно, без скачков) и обратимы. Если восстановить потенциал покоя, проводимость уменьшается по экспоненте к первоначальной низкой величине. Скорость уменьшения натриевой проводимости примерно в 10 раз больше, чем калиевой.

А. Л. Ходжкин и А. Ф. Хаксли рассчитали форму распространяющегося потенциала действия, возникающего при электрическом

раздражении аксона без фиксации потенциала. Эти рассчитанные значения потенциала действия были похожи на зарегистрированный потенциал действия (рис. 7.5, *в*). Параллельно было изучено влияние на входящий и выходящий токи различных величин смещения мембранного потенциала от уровня поддерживаемого потенциала.

Итак, если V_m поддерживать постоянным, то емкостный ток будет течь только очень короткое время, лишь в самый момент сдвига мембранного потенциала до нового значения. Затем этот ток прекратится, поскольку величина dV_m/dt (скорость изменения мембранного потенциала) будет равна нулю. При этом мембранный ток становится простой функцией мембранной проводимости (g_m) и напряжения (V_m):

$$I_m = g_m \Delta V_m.$$

Ток, который должен подаваться усилителем обратной связи *для поддержания заданной величины мембранного потенциала*, в точности равен общему мембранному току, протекающему при данном мембранном потенциале через участок мембраны, на котором напряжение фиксировано. Эти токи позволяют оценивать изменения общей ионной проводимости (а отсюда — и специфических ионных проводимостей), вызываемые изменением мембранного потенциала.

При нефиксированном потенциале сдвиг мембранного потенциала обычно ведет к изменению ионных проводимостей, что, в свою очередь, вызывает вторичные изменения мембранного потенциала. Фиксация напряжения предотвращает эти вторичные сдвиги. Так, например, деполяризация мембраны электрическим импульсом от величины поддерживаемого потенциала (например, потенциала покоя, равного −60 мВ) до 0 мВ в условиях фиксации тока (метод измерения потенциала) вызовет потенциал действия, который пересечет нулевую линию, поскольку напряжение на аксоне не фиксировано.

При фиксации напряжения потенциал на мембране можно удержать на уровне 0 мВ (рис. 7.6, *а*). Этот сдвиг мембранного потенциала на 60 мВ вызовет кратковременный емкостной ток, за которым последует двухфазный ионный ток (рис. 7.6, *б*) — сначала входящий, а затем спустя 2 мс — выходящий.

Рассмотрим ответ мембраны клетки на ступенчатое смещение мембранного потенциала относительно поддерживаемого потенциала (потенциала покоя). Пусть мембранный потенциал поддерживается на величине −60 мВ, равной величине потенциала покоя клетки.

В этом случае мы не зарегистрируем ни входящего, ни выходящего тока, и прибор, регистрирующий ток, будет показывать нулевую линию. Теперь ступенчато сместим поддерживаемый потен-

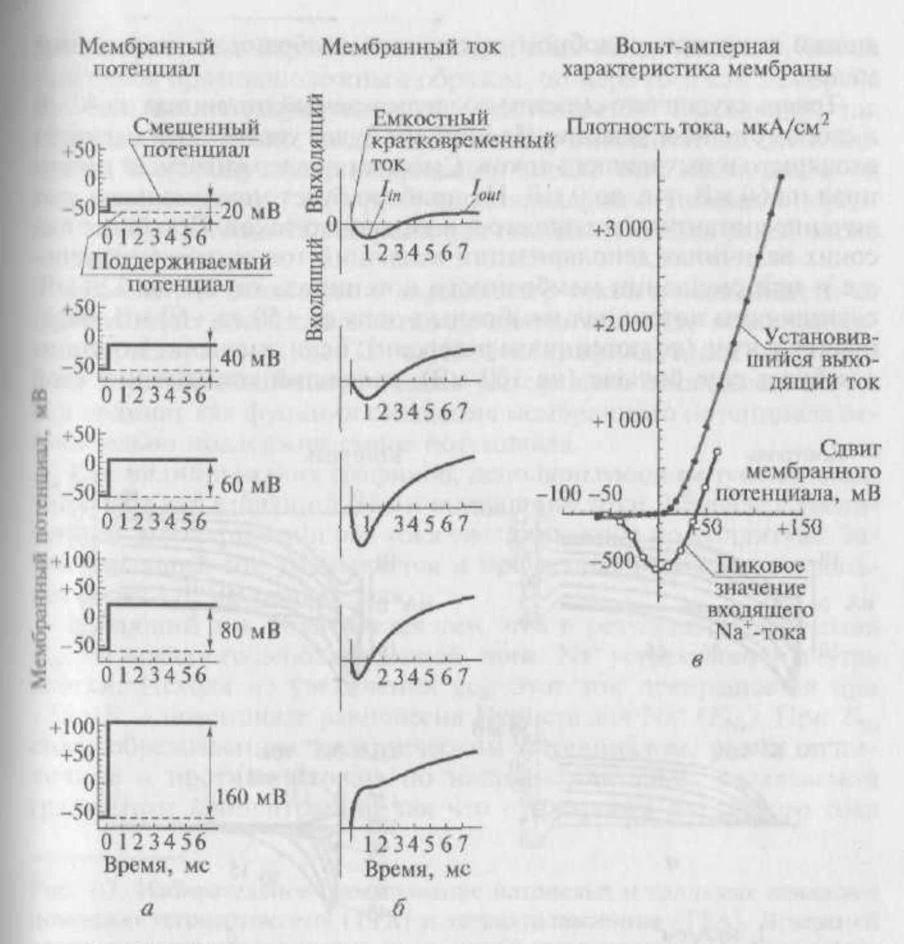


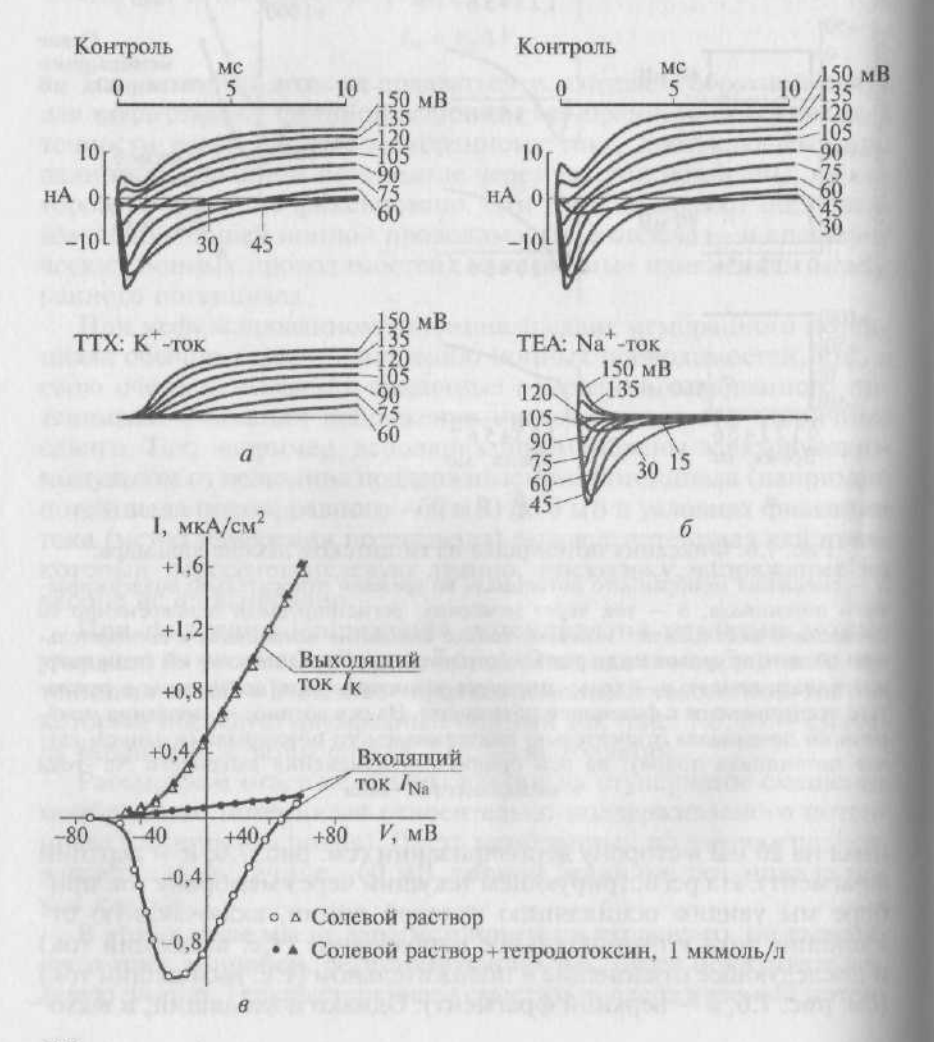
Рис. 7.6. Фиксация потенциала на гигантском аксоне кальмара:

а — смещения мембранного потенциала во времени относительно поддерживаемого потенциала; *б* — ток через мембрану, регистрируемый одновременно со смещением потенциала. Показаны только смещения потенциала в положительную область от уровня поддерживаемого потенциала, равного −60 мВ (например, потенциала покоя); *в* — вольт-амперные характеристики, полученные в результате экспериментов с фиксацией потенциала. На оси абсцисс — смещения мембранного потенциала относительно поддерживаемого потенциала (в данном случае потенциала покоя); на оси ординат — изменения входящего Na$^+$-тока и выходящего K$^+$-тока

циал на 20 мВ в сторону деполяризации (см. рис. 7.6, *а* — верхний фрагмент). На регистрирующем текущий через мембрану ток приборе мы увидим осцилляцию нулевой линии, включающую отклонение тока в отрицательное направление (т.е. входящий ток) и последующее отклонение в положительном (т.е. выходящий ток) (см. рис. 7.6, *б* — верхний фрагмент). Однако и входящий, и выхо-

дящий токи при подобном смещении мембранного потенциала малы.

Теперь ступенчато сместим поддерживаемый потенциал на 40 мВ в сторону деполяризации. На приборе будет увеличение амплитуд входящего и выходящего токов. Сместим поддерживаемый потенциал на 60 мВ, т.е. до 0 мВ. На приборе будет максимальное увеличение амплитуды входящего и выходящего токов. При более высоких величинах деполяризации входящий ток становится меньше и при смещении мембранного потенциала от 110 до 120 мВ, сдвигающим потенциал мембраны в зону от +50 до +60 мВ, обращается в нуль (до потенциала реверсии). Если смещение потенциала будет еще больше (на 160 мВ), входящий ток изменит свой



знак и будет течь наружу. Выходящий ток с увеличением ступенек ведет себя противоположным образом: по мере того как мембрана все больше деполяризуется, он увеличивается. Выходящий ток уменьшается только тогда, когда мембранный потенциал изменяется в сторону гиперполяризации (после того как вначале он был быстро сдвинут в сторону деполяризации ступенькой порядка 84 мВ). Потенциал реверсии для выходящего тока равен около –80 мВ.

Изменения входящего и выходящего токов в зависимости от мембранного потенциала легко представить в виде вольт-амперных характеристик (рис. 7.6, *в*). На этих графиках пики входящего тока и установившиеся значения выходящего откладываются по оси ординат как функции смещения мембранного потенциала относительно поддерживаемого потенциала.

Как видно из таких графиков, деполяризующие ступеньки активируют как входящий, так и выходящий токи. Вначале с увеличением деполяризации оба тока увеличиваются по амплитуде. Затем входящий ток уменьшается и при деполяризующих ступеньках более 110 мВ меняет знак.

Входящий ток объясняется тем, что в результате увеличения g_{Na}, вызываемого деполяризацией, ионы Na^+ устремляются внутрь клетки. Исходя из увеличения g_{Na}, этот ток прекращается при +55 мВ — потенциале равновесия Нернста для Na^+ (E_{Na}). При E_{Na} сила, обусловленная электрическим потенциалом, равна по величине и противоположна по направлению силе, создаваемой градиентом концентрации, так что суммарного натриевого тока

Рис. 7.7. Избирательное блокирование натриевых и калиевых каналов с помощью тетродотоксина (ТТХ) и тетраэтиламмония (ТЕА). В верхней части рисунка представлены наложенные друг на друга 7—9 записей, сделанных в условиях фиксации потенциала (на уровнях от 30 до 150 мВ) на одном перехвате Ранвье седалищного нерва лягушки. На записях цифрами показаны смещения мембранного потенциала от поддерживаемого потенциала (в данном случае потенциала покоя, равного около –75 мВ), кратные 15 мВ. Входящий ток направлен вниз, а выходящий — вверх. Поскольку площадь мембраны перехвата, на которой фиксировали напряжение, нельзя определить точно, указана сила тока (в наноамперах), а не его плотность:

а — изменение тока во времени в опыте с обычным солевым раствором; *б* — изменение тока во времени в опыте в присутствии ТЕА. В присутствии ТТХ Тетродотоксин блокирует ту часть общего мембранного тока, которая переносится ионами Na^+, но не K^+, т.е. входящий натриевый ток, оставляя без изменений выходящий калиевый ток. Влияние ТЕА на ток показывает, что это соединение блокирует калиевый, но не натриевый ток; *в* — вольт-амперные характеристики гигантского аксона *Myxicola*, показывающие I_{Na} (белые кружки) и I_K (белые треугольники) в контрольных условиях и демонстрирующие, что ТТХ (1 мкмоль/л) блокирует I_{Na} (черные кружки), но не I_K (черные треугольники)

нет. При еще большей деполяризации первая из этих сил становится больше второй, и ионы Na^+ начинают выходить из клетки наружу, изменяя тем самым направление тока.

Подобным образом особенности выходящего тока определяются тем, что его носителями служат ионы K^+. По мере деполяризации мембраны силы электрического поля, которые стремятся удержать K^+ внутри клетки, уменьшаются, что приводит ко все большему преобладанию направленных наружу сил, обусловленных градиентом концентрации K^+.

Эксперименты с заменой ионов и полученные результаты требовали независимых исследований с селективным блокированием различных ионных каналов. Эти поиски увенчались успехом, и сходные кривые были получены, когда вместо замены ионов применяли высокоселективные соединения, блокирующие ионные каналы, например при введении в перфузионный раствор, окружающий клетку, тетродотоксина (ТТХ) — яда японской рыбы иглобрюха. Он воздействует только на нарастание g_{Na}, происходящее при деполяризации мембраны. Его эффект крайне специфичен.

Тетродотоксин не влияет на калиевую проводимость, более того, он даже не особенно подавляет функцию тех натриевых каналов, которые действуют в покоящейся мембране (а также каналов, активируемых медиаторами) (рис. 7.7, *а*).

Тетродотоксин блокирует только повышенную проводимость g_{Na}, которая появляется при деполяризации.

Другое вещество — тетраэтиламмоний (ТЕА) — подавляет калиевую проводимость, возрастающую при деполяризации, но только тогда, когда оно введено внутрь аксона (рис. 7.7, *б*); ТЕА не влияет на g_{Na}.

Избирательность действия фармакологических соединений позволила установить и другие детали. Например, когда внутрь аксона вводят проназу — фермент, расщепляющий белки, она избирательно нарушает инактивацию g_{Na}. После обработки аксона проназой натриевый ток нарастает обычным образом, но потом не спадает: он остается большим в течение всего времени деполяризации.

Первый сделанный из этого вывод заключался в том, что включение и выключение g_{Na} — это два независимых процесса. Второй вывод основывался на следующей дополнительной информации, известной биохимикам. Проназа представляет собой комплекс из 11 ферментов. Последовательное введение каждого из них в клетку показало, что к избирательному нарушению инактивации g_{Na} приводит только введение В-щелочной протеазы. Поскольку она селективно отщепляет аргинин от белковой цепочки, было постулировано, что инактивационные ворота Na^+-канала представляют собой аргинин.

7.2. Фиксация потенциала у клеток

Хотя методика фиксации потенциала на аксонах, которую начали применять в 1950-х гг., открывала широкие перспективы изучения ионных токов, она была адекватна только для аксонов. Исследование самих клеток этим методом началось на 20 лет позднее. Это время потребовалось на то, чтобы приспособить метод фиксации потенциала к исследованиям клеток, что не удавалось из-за технических трудностей. Это связано с тем, что только микроэлектроды являлись единственным «датчиком», позволявшим присоединить управляющую и регистрирующую аппаратуру к мембране клетки. Усилия экспериментаторов сводились к тому, чтобы максимально приблизиться к условиям адекватного использования метода фиксации потенциала с применением микроэлектродов непосредственно на клетке.

Для выполнения экспериментов на клетках Э. Неер и Х.Д. Люкс (E. Neher, H.D. Lux, 1971), модифицировав более раннюю идею К. Франка и Л. Тауца (K. Frank, L. Tauc, 1963), разработали метод измерения трансмембранного тока, протекающего через ограниченный участок мембраны клетки. Необходимым условием адекватного использования метода является условие пространственной фиксации потенциала, т.е. разность потенциалов должна иметь заданную постоянную величину на всей площади мембраны, через которую протекает измеряемый ток. Метод заключался в следующем. На мембране нервной клетки с помощью двух введенных в клетку микроэлектродов регистрируют и фиксируют потенциал. К клетке прижимают (или подсасывают под давлением) двуствольную микропипетку, заполненную нормальным раствором. Подключенная к ней независимая следящая система фиксирует потенциал в объеме между кончиком микропипетки и мембраной на нулевом уровне. В результате на выходе следящей системы образуется сигнал, пропорциональный величине тока через участок мембраны, ограниченный площадью сечения микропипетки. Преимущество описанного метода очевидно: измеряется ток, протекающий только через тот участок мембраны, для которого заведомо выполняется пространственное условие фиксации потенциала. Недостаток метода заключается в трудности замены наружного раствора в двуствольной микропипетке. Тем не менее его использование позволило получить ряд важных результатов. Оказалось, что ионные токи нервных клеток качественно сходны с ионными токами аксона.

Исследования методом фиксации потенциала были выполнены на изолированных клетках разных тканей. Изолированная клетка представляет собой эквипотенциальную сферу и не требует дополнительных устройств. Для осуществления метода использовали электронно-измерительную схему, приведенную на рис. 7.8, и два

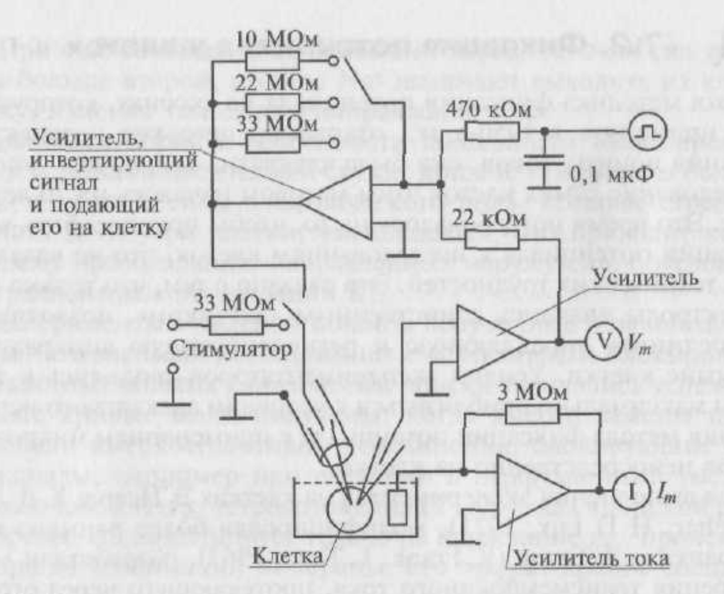


Рис. 7.8. Блок схема установки для исследования клеток (например, нервных) методом фиксации потенциала с двумя микроэлектродами. Токовый микроэлектрод экранирован

микроэлектрода, введенных в одну клетку. Мембранный потенциал регистрируется микроэлектродом и подается на усилитель напряжения. С помощью электронной схемы с обратной связью его можно длительное время фиксировать (или поддерживать) на любом уровне путем пропускания тока через второй микроэлектрод, поэтому данный потенциал также называется поддерживаемым (holding potential). При помощи генератора прямоугольных импульсов электрического тока на мембране поддерживаемый потенциал можно смещать до некоторой новой величины и удерживать на этом уровне также с помощью электронной схемы с обратной связью. Ток, протекающий через этот участок мембраны при поддерживаемом потенциале или под влиянием приложенного напряжения, измеряют отдельным усилителем.

Наиболее существенный недостаток микроэлектродного метода исследования нервных клеток заключается в ограничении быстродействия системы фиксации потенциала. Эта методика применительно к клеткам имела существенные ограничения, заключающиеся в том, что изучать влияние различных соединений на ионные токи можно было только со стороны наружной поверхности мембраны. Если у аксона аксоплазму можно было выдавить, как зубную пасту из тюбика, и заменить новым раствором, то очевидно, что такую манипуляцию с клетками проделать невозможно.

7.3. Фиксация потенциала при диализе клеток

Огромным шагом вперед было открытие в 1976 г. в Советском Союзе в Институте физиологии им. А.А. Богомольца (Киев) под руководством академика АН СССР П.Г. Костюка метода внутриклеточного диализа. Этот метод позволял осуществлять полную замену внутриклеточной среды в изолированных клетках. Экспериментальная камера посредством полиэтиленовой перегородки делилась на два отсека (рис. 7.9). В перегородке с помощью иглы просверливали коническое отверстие, соответствующее размерам изучаемой клетки. Стенки поры покрывали специальным составом, к которому «приклеивалась» подведенная микропипеткой клетка. Резкое создание в нижнем отсеке отрицательного давления разрывало часть мембраны, находящуюся с этой стороны. Таким образом, с

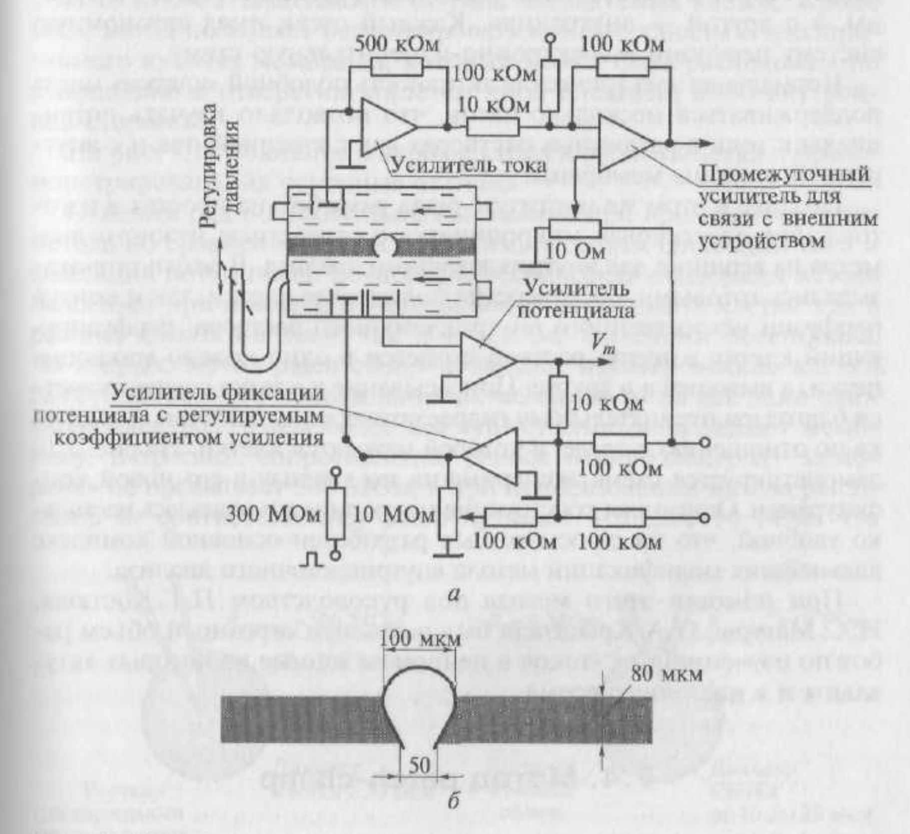


Рис. 7.9. Схема установки для внутриклеточного диализа и фиксации потенциала:

а — блок-схема метода; *б* — диализирующая пора. Размеры поры показаны применительно к гигантским нейронам моллюсков

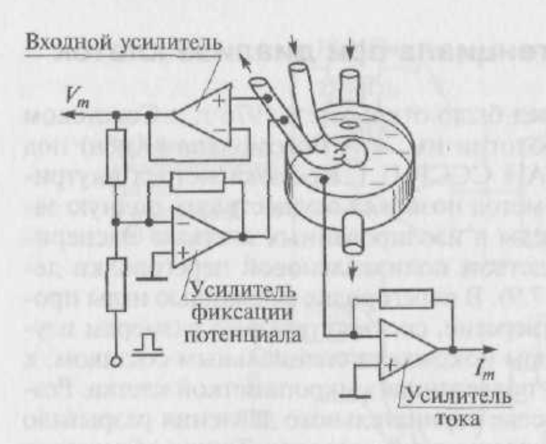


Рис. 7.10. Модификация метода внутриклеточного диализа

одной стороны перегородки находилась внешняя часть мембраны, а с другой — внутренняя. Каждый отсек имел автономную систему перфузии и электронно-измерительную схему.

Нормальная электрическая активность подобной «клетки» могла поддерживаться несколько часов, что позволяло изучать потенциалы и токи в различных растворах как с внешней, так и с внутренней стороны мембраны.

Позднее в этом же институте была разработана простая в изготовлении пластиковая микропипетка с отверстием нужного диаметра на вершине для внутриклеточного диализа. В результате оказывались готовыми как отверстие подведения клетки, так и контур перфузии искусственного внутриклеточного раствора: перфузирующий клетку изнутри раствор подается в одно колено микропипетки, а выводится в другое. Присасывание к клетке осуществляется благодаря отрицательному гидростатическому давлению в пипетке по отношению к среде, в которой находятся клетки. На рис. 7.10 демонстрируется схема эксперимента по диализу в его новой конфигурации. Описанная конструкция микропипетки оказалась настолько удобной, что на ее основе был разработан основной комплекс дальнейших модификаций метода внутриклеточного диализа.

При помощи этого метода под руководством П. Г. Костюка, И. С. Магуры, О. А. Крышталя был выполнен огромный объем работ по изучению Ca^{2+}-токов в нейронах, многие из которых актуальны и в настоящее время.

7.4. Метод patch-clamp

7.4.1. Конфигурации «patch-пипетка — мембрана»

Подлинный расцвет исследований мембран клеток дал так называемый метод patch-clamp, который был разработан на основе

метода диализа клеток. Этот крайне сложный в те годы метод предложили в 1976 г. Э. Неер и Б. Сакман (B. Sakmann). В его основе лежал принцип исследования клеток методом диализа с рядом технических модификаций, однако уже в 1981 г. после публикаций О. П. Хемилла и соавторов (O. P. Hamill et al.) этот метод превратился в общедоступный, позволяющий проводить любые измерения на клеточном уровне. В настоящее время все электрофизиологические исследования мембран клеток проводятся с применением данного метода. На этом методе мы остановимся более подробно.

Метод patch-clamp позволяет регистрировать на изолированных клетках их потенциалы, токи или одиночные ионные каналы посредством специальной стеклянной пипетки (patch-пипетки), напоминающей микроэлектрод, но имеющей сопротивление от 2 до 10 МОм в зависимости от типа исследуемых клеток. Кроме того, метод позволяет регистрировать ионные каналы с изолированного кусочка мембраны, который может быть расположен по отношению к отверстию пипетки либо внешней, либо внутренней стороной.

На рис. 7.11 показаны микроэлектрод и patch-пипетка и продемонстрированы их основные отличия.

Отметим ряд положительных моментов при применении этого метода по сравнению с классическими методам фиксации тока и фиксации потенциала. Во-первых, техническая поддержка метода позволяет при помощи одного прибора исследовать клетки как в режиме фиксации тока, так и в режиме фиксации потенциала. Во-вторых, метод patch-clamp позволяет изучать мелкие клетки без существенного повреждения их мембран, тогда как даже один микроэлектрод, а тем более два существенно повреждают мембрану. В-третьих, сопротивление утечки «микроэлектрод—мембрана» не превышает 500 МОм, а при использовании метода patch-clamp и, соответственно, patch-пипетки — более 10 ГОм, что

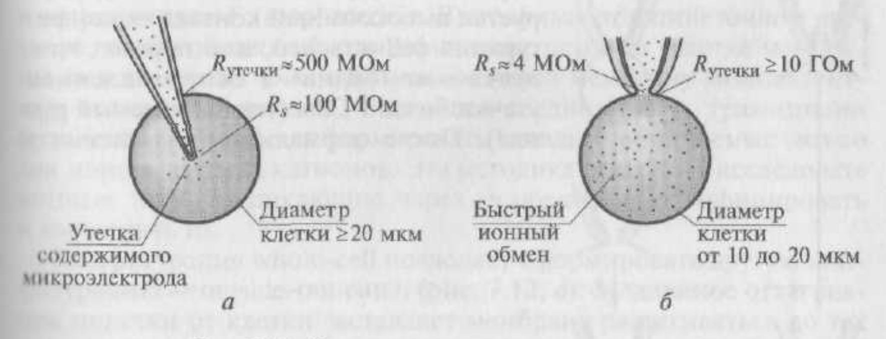


Рис. 7.11. Сравнение методов регистрации:
а — с помощью обычного микроэлектрода; *б* — patch-пипетки

существенно влияет на качество регистрации. В-четвертых, микроэлектроды имеют сопротивление, достигающее 100 МОм, а patch-пипетки — от 2 до 10 МОм, что позволяет не только качественно регистрировать потенциалы и токи клетки, но и вводить в клетки без особых проблем любые соединения.

Для исследований методом patch-clamp существует несколько практически одинаковых приборов, например BioLigic, Axopatch, List Elektronik, которые позволяют в режиме current clamp (фиксация тока) регистрировать потенциалы клеток и осуществлять их электрическое раздражение, а в режиме voltage clamp (фиксация потенциала) измерять суммарные ионные токи клетки или токи через одиночные ионные каналы. Эти приборы комплектуются аналогово-цифровыми преобразователями, которые выполнены либо как отдельные приборы, либо как карты, устанавливающиеся в персональный компьютер. Кроме того, в комплект поставки включены программа для регистрации процессов во всех режимах работы и программа для обработки зарегистрированных процессов.

Поскольку практически все известные в настоящее время эксперименты получены методом patch-clamp, мы подробно остановимся на ряде методических вопросов. Без их понимания достаточно трудно достигнуть полной ясности полученных этим методом результатов.

На рис. 7.12 показаны различные конфигурации patch-clamp по отношению к клетке или фрагменту ее мембраны. Сначала пипетку подводят вплотную к мембране изолированной клетки (рис. 7.12, *а*) и создают в ней небольшое отрицательное давление (рис. 7.12, *б*). Это приводит к тому, что мембрана плотно закупоривает отверстие пипетки и формируется высокоомный контакт — конфигурация cell-attached, или переход «пипетка — мембрана» с сопротивлением утечки более 1 ГОм (так называемый giga seal). После нормализации давления в

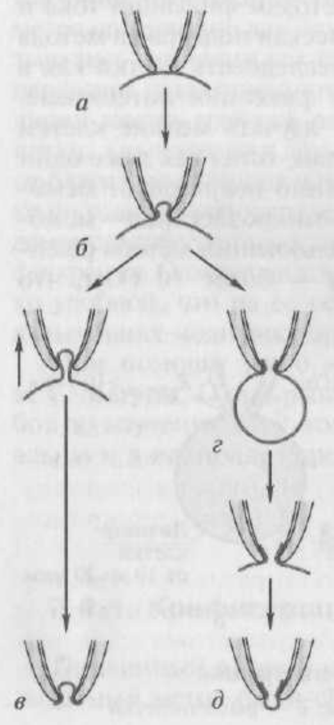


Рис. 7.12. Схема различных конфигураций patch-clamp (*а—д*)

пипетке конфигурация cell-attached близка к физиологической ситуации, поскольку зона мембраны, захваченная пипеткой, с внутренней стороны контактирует с внутриклеточной жидкостью, а с внешней стороны — со стандартным внеклеточным раствором, которым заполняют patch-пипетку. Эта конфигурация, с одной стороны, позволяет регистрировать одиночные ионные каналы под пипеткой, а с другой — является промежуточной для других конфигураций. Она позволяет изучать на одиночном канале роль вторичных мессенджеров, которые включаются через рецепторы плазматической мембраны.

Конфигурация cell-attached позволяет сформировать другую конфигурацию, называемую inside-out patch. К ее образованию приводит резкое отрывание пипетки от клетки (рис. 7.12, *в*), причем giga seal не меняется. В этом случае на пипетке находится лишь фрагмент мембраны (patch), внутренняя сторона которой смотрит в омывающий раствор перфузионной камеры, а внешняя контактирует с содержимым пипетки. Данная конфигурация используется для изучения вклада соединений цитоплазмы в канальную активность.

Конфигурация cell-attached позволяет двумя путями (в зависимости от задач исследователя) сформировать конфигурацию, называемую whole-cell. В одном случае для ее получения в пипетку необходимо резко и одномоментно подать небольшое отрицательное давление, разрывающее мембрану под пипеткой и образующее низкоомный путь между внутренней средой клетки и раствором в пипетке. При этом в мембране возникает дырка, величина которой позволяет осуществлять обмен ионов и различных соединений между пипеткой и цитоплазмой (рис. 7.12, *г*).

В другом случае низкоомный путь между внутренней средой клетки и раствором в пипетке формируется за счет влияния соединений, находящихся в пипетке и вызывающих образование в мембране пор, проницаемых для ионов, но не для молекул. Это перфоративный (perforated) patch. Антибиотики нистатин (nystatin) и амфотерицин-Б (amphotericin-B) используют в пипеточном растворе, чтобы образовать специфические поры на участке мембраны под пипеткой. Они пропускают через мембрану моновалентные катионы и анионы. Еще одно соединение — грамицидин (gramicidin) — помогает формировать каналы, проницаемые только для моновалентных катионов. Эта методика позволяет исследовать ионные токи, протекающие через мембрану, идентифицировать и вычленить их.

Конфигурация whole-cell позволяет сформировать другую конфигурацию — outside-out patch (рис. 7.12, *д*). Медленное оттягивание пипетки от клетки заставляет мембрану растягиваться до тех пор, пока она не отделится от клетки и не сошьется. Теперь ее внутренняя часть будет контактировать с раствором в пипетке, а

внешняя — с омывающим раствором в перфузионной камере. Эта конфигурация используется для изучения вклада соединений внешней среды клетки в активность единичных каналов.

7.4.2. Patch-пипетки

При всех конфигурациях patch-clamp используют patch-пипетки, основное различие которых в зависимости от задач экспериментатора заключается в их сопротивлении, т.е. в диаметре кончика patch-пипетки. Patch-пипетки, кончик которых представлен на рис. 7.13, обычно вытягивают из стандартных коммерческих капилляров.

Patch-пипетки изготавливают вытягиванием в две стадии, как предложили О.П.Хэмилл и соавторы (O. P. Hamill et al., 1981). На первом этапе вытягивания patch-пипетки капилляр должен приобрести утончение диаметром 200—400 мкм в месте расположения спирали (в месте разогрева). На втором этапе диаметр уменьшается до 1—2 мкм, и в результате разрыва утончения получаются две patch-пипетки.

Принцип вытягивания patch-пипеток не является критичным для дальнейшей работы, поэтому пригодны многие типы кузниц. Они должны иметь небольшую силу рывка, приспособление для остановки на первом этапе вытягивания и плавный, точный режим нагрева спирали. Во многих лабораториях используется так называемая кузница Копфа (David Kopf Instruments, USA). Эта кузница имеет сверху фиксированный и снизу подвижный держатели для капилляра, поэтому две полученные patch-пипетки не являются идентичными, при этом обычно используют только

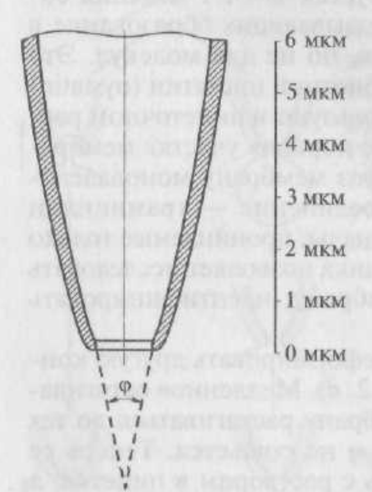


Рис. 7.13. Реконструкция продольного среза через кончик patch-пипетки сопротивлением 2,0—2,5 МОм, выполненная на основе данных, полученных с помощью сканирующего микроскопа. Угол схождения кончика равен 24°. Диаметр отверстия 1,1 мкм, ширина кольца 0,2 мкм. Для сканирующей электронной микроскопии кончики patch-пипеток покрывали слоем золота толщиной 200 Å

нижнюю patch-пипетку (при наличии горизонтальной программируемой кузницы можно использовать обе полученные пипетки, которые имеют после вытяжки одинаковые параметры). После первого этапа происходит автоматическое отключение нагрева спирали. Для реализации второго этапа вновь включают нагрев спирали, находящейся в центре утончения, и после разогрева стекла в результате разрыва утончения получаются две patch-пипетки.

Многие исследователи обычно оплавляют полученные patch-пипетки. Их крепят на отдельном микроманипуляторе так, чтобы нагревательный элемент и patch-пипетку можно было перемещать независимо. При оплавлении кончик patch-пипетки выдерживают в течение нескольких секунд на расстоянии 2—10 мкм от стеклянного покрытия нагревательного элемента. Обычно у неоплавленного электрода хорошо видно отверстие кончика. При оплавлении просвет становится невидимым. Раньше размер кончика patch-пипетки в этом случае оценивают путем пропускания воздуха через patch-пипетку, кончик которой погружен в метанол. Для этого patch-пипетку соединяют при помощи полиэтиленовой трубочки длиной 10 см со шприцем объемом 10 мл.

Если к patch-пипетке приложить давление, то из его кончика начнут выходить пузырьки воздуха, как только величина давления превысит поверхностное натяжение на границе фаз воздух — метанол. Поскольку поверхностное натяжение обратно пропорционально радиусу кривизны, из кончиков с большим диаметром пузырьки воздуха будут появляться при меньшем давлении. Пороговое давление называют bubbles number (пузырьковое число). Для его определения поршень шприца устанавливают исходно на отметке 10 мл и замечают его положение в момент появления пузырьков. Эта величина в кубических сантиметрах и есть bubbles number. Оно равно 10, деленному на пороговое давление в атмосферах. Хотя пузырьковое число является лишь оценочным параметром и зависит от геометрии кончика, этот способ измерения размеров кончика более точный, чем метод, основанный на определении сопротивления, и позволяет оценивать размеры до заполнения электродов электролитом. По примерным оценкам электроды с bubbles number 3,0—3,5 приемлемы для большинства типов регистрации, с 4,0—4,5 — для регистрации на целой клетке и с 1,5—2,5 — при работе с такими малыми легко деформирующимися клетками, как эритроциты.

Заполнение patch-пипеток со стекловолокном осуществляют с широкого конца с помощью шприца объемом 5 мл и длинной тонкой иглы. Как и все используемые при patch-clamp растворы, пипеточный раствор должен быть очень чистым, поэтому между шприцем и иглой помещают фильтр толщиной 0,2 мкм. Patch-пипетки не следует заполнять до конца. Необходимо ос-

тавлять примерно 1,0—1,5 см от широкого края. Во-первых, это уменьшает вероятность попадания жидкости в держатель (его смачивание может сильно увеличить амплитуду шума), во-вторых, емкость электрода по отношению к земле или источникам шума увеличивается с радиусом проводника, а заполненный электрод имеет больший радиус, чем введенная в него серебряная проволочка. Надо отметить, что серебро, вводимое в рабочую patch-пипетку, и серебро, играющее роль индифферентного электрода, необходимо перед экспериментами тщательно хлорировать, уравновешивая потенциал.

Важное замечание касается иглы для инъекций. При использовании пипеточных растворов с EGTA небольшое количество раствора (около 100 мкл), находящегося в металлической игле, очень сильно закисляется в течение нескольких минут. Возможно, EGTA хелатирует ионы металла и высвобождает протоны. Для всех растворов с EGTA (а лучше для всех растворов вообще) следует использовать вытянутую при нагревании до маленького диаметра полиэтиленовую трубочку.

После заполнения 150 ммоль/л раствором KCl patch-пипетки имеют сопротивление по постоянному току от 1 до 5 МОм. Значение сопротивления определяет прежде всего степень нагрева спирали на второй стадии вытягивания. На рис. 7.13 показано, как выглядит в сканирующем электронном микроскопе кончик patch-пипетки, имеющей сопротивление 2,5 МОм — типичной величины при регистрации в конфигурации cell attached. Средний диаметр отверстия кончика, измеренный в положении «вид с торца», составлял при этом 1,13 мкм. Это соответствует площади отверстия кончика 1,0 мкм^2. Толщина стенок торца, оцениваемая по тени кольца, окружающего отверстие, составляет в среднем 0,19 мкм. Угол схождения конуса кончика и толщину стенок можно определить в положении «вид сбоку» (см. рис. 7.13). Размеры типичного кончика patch-пипетки указаны на рис. 7.13, на котором представлен поперечный срез через patch-пипетку сопротивлением 2,0—2,5 МОм.

Для того чтобы получить те или иные конфигурации, необходимо, прежде всего, получить конфигурацию cell-attached. После подсоединения пипетки к держателю при помощи шприца подают небольшое положительное давление (примерно 0,01 мл) и вводят patch-пипетку в перфузионную камеру. При этом включают программу, которая создает прямоугольные импульсы электрического тока отрицательной полярности амплитудой не более –7 мВ и частотой 1 Гц при значении усилителя ×2. Подведя patch-пипетку к клетке, снимают давление в пипетке и касаются мембраны клетки.

Иногда при работе с некоторыми клетками, например с изолированными с помощью ферментов клетками миокарда или клет-

ками скелетных мышц, гигаомные контакты формируются спонтанно. При прикосновении кончиком пипетки к поверхности клетки высокоомный контакт образуется без подсасывания и даже при небольшом избыточном давлении в пипетке.

Если спонтанного формирования гигаомного контакта не происходит, то в шприце на 1 мл, который соединен с patch-пипеткой, создают небольшое отрицательное давление (примерно 0,2 мл), в результате чего регистрируется повышение переходного сопротивления «стекло кончика patch-пипетки — мембрана клетки». Обычно в течение 1,0—1,5 мин это сопротивление достигает требуемых величин, например 2,0—2,5 ГОм для кардиомиоцитов. Если этого не происходит и сопротивление прекращает возрастать при величине в диапазоне 500 — 700 МОм, то шприц можно снять, тогда во многих случаях увеличение сопротивления происходит за считанные секунды. Чем больше величина переходного сопротивления, тем более точно будет осуществляться последующая регистрация тока в той или иной конфигурации.

После достижения величины переходного сопротивления 200 МОм включают программу, обеспечивающую генерацию импульсов электрического тока с необходимыми для эксперимента параметрами. Переключают усилитель на ×10 (или ×20 при необходимости). Помимо регистрируемой величины переходного сопротивления можно ориентироваться в первом приближении на идущий одновременно с повышением сопротивления процесс уменьшения амплитуды прямоугольного импульса электрического тока. При указанном усилении о достижении необходимого переходного сопротивления свидетельствуют отсутствие прямоугольного сигнала на экране монитора и наличие емкостных пиков, соответствующих фронту нарастания сигнала (в положительную область) и фронту падения сигнала (в отрицательную область).

Отдельный вопрос связан с раствором, которым заполняют patch-пипетки. В стандартных микроэлектродных исследованиях для заполнения микроэлектродов обычно используют 2,5 М раствор KCl. Чем же заполнять patch-пипетки? В 1980-х гг. на этот вопрос ответил директор Института физиологии университетского городка Гиссен (Giessen, ФРГ) В. Фогель (W. Fogel) (рис. 7.14). Для patch-пипетки нужен тот раствор, состав которого определяется конкретными задачами экспериментатора.

Рассмотрим этот вопрос, например, для patch-пипетки, которая будет использована для создания конфигурации whole-cell у изолированных кардиомиоцитов. Раствор такой пипетки будет иметь прямую связь с внутриклеточным раствором, причем степень диффузии ионов и каких либо соединений в клетку будет достаточно высокой из-за низкого сопротивления (т. е. большого отверстия) patch-пипетки. Некий «средний» внутриклеточный раствор кар-

Рис. 7.14. Профессор В. Фогель (W. Fogel) (слева) и профессор А. Камкин в институте физиологии Гиссенского университета (ФРГ), 1985 г. Профессор В. Фогель внес огромный вклад в развитие представлений об ионных токах в нервных клетках и аксонах

диомиоцита включает 15 ммоль/л Na^+, 145 ммоль/л K^+, 10^{-4} ммоль/л Ca^{2+} и другие ионы, которые обычно не учитываются. Данные внутриклеточные концентрации ионов рассчитаны по свободным концентрациям в цитоплазме. С учетом известных внеклеточных концентраций ионов перфузионный раствор должен содержать 150 ммоль/л NaCl, 5,4 ммоль/л KCl, 1,8 ммоль/л $CaCl_2$, 1,2 ммоль/л $MgCl_2$, 20 ммоль/л глюкозы и 5 ммоль/л HEPES*/NaOH (pH 7,4).

В то же время раствор для patch-пипеток должен отвечать известным требованиям, которые определяются тем, что мы хотим зарегистрировать. Поставим следующую задачу эксперимента. Нам необходимо зарегистрировать в режиме voltage clamp суммарный ионный ток, включающий кальциевый и калиевый компоненты (рис. 7.15) и в режиме current clamp зарегистрировать потенциал действия кардиомиоцита (рис. 7.16). Для этих целей используют упомянутый перфузионный раствор, а раствор patch-пипетки должен соответствовать внутриклеточному раствору и включать в себя приблизительно 140 ммоль/л KCl, 5,5 ммоль/л $MgCl_2$, 5 ммоль/л Na_2АТФ, 0,01 ммоль/л EGTA, 10 HEPES/KOH (pH 7,2).

Если задача эксперимента — регистрация только пика кальциевого тока, раствор должен включать в себя 140 ммоль/л CsCl; 5,5 ммоль/л $MgCl_2$; 5 ммоль/л Na_2-АТФ; 0,01 ммоль/л EGTA;

* 4-(2-Гидроксиэтил)-пиперазин-1-этансульфоновая кислота.

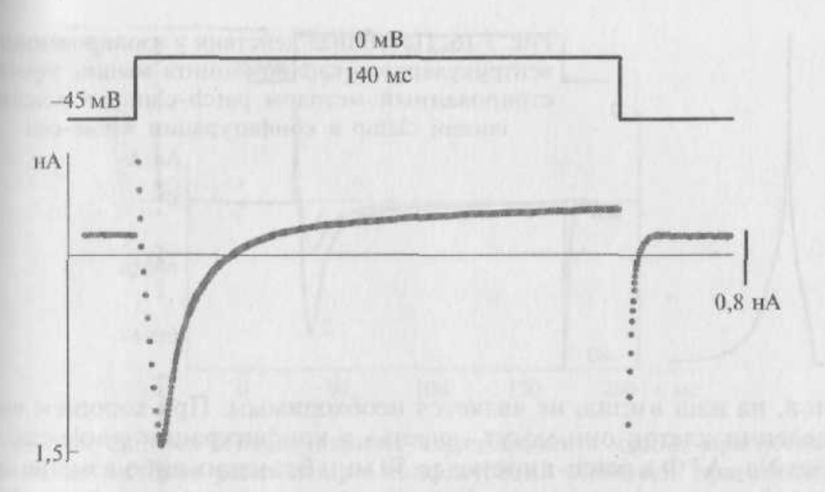


Рис. 7.15. Ca^{2+}-ток у изолированного вентрикулярного кардиомиоцита мыши, зарегистрированный методом patch-clamp в конфигурации whole-cell, при смещении мембранного потенциала до 0 мВ относительно поддерживаемого потенциала величиной –45 мВ. Na^{+}-ток подавлен поддерживаемым на уровне –45 мВ потенциалом

10 HEPES/KOH (pH 7,2). В этом случае Cs^{+} выступает как блокатор калиевого тока. Для полного ингибирования Na^{+}-тока можно добавить необходимое количество блокаторов Na^{+}-каналов, имеющихся в данном типе клеток, хотя обычно правильно подобранная величина holding potential ингибирует Na^{+}-ток. Разумеется, что *во внеклеточном растворе 5,4 ммоль/л KCl надо также заменить* на 5,4 ммоль/л CsCl (рис. 7.17).

Если же в дополнение к регистрации пика кальциевого тока следует изучать его инактивацию, экспериментатору необходимо ввести в пипетку соответствующие блокаторы калиевых каналов, поскольку присутствие только ионов Cs^{+} не даст необходимого эффекта блокирования всех каналов выходящего тока. Если при этом требуется следить за внутриклеточным Ca^{2+}, то необходимо, чтобы в patch-пипетке было фиксированное pCa. Так, при необходимости иметь pCa = 6 patch-пипетки должны содержать 4,5 ммоль/л $CaCl_2$ и 5 ммоль/л EGTA. При необходимости иметь pCa = 7 patch-пипетки должны содержать 5 мкмоль/л EGTA. Для создания pCa = 8 patch-пипетки должны содержать 5 ммоль/л BAPTA*.

В заключение следует отметить, что добавление в patch-пипетку 5 ммоль/л Na_2-АТФ для предотвращения run-down кана-

* Тетранатриевая соль 1,2-*бис*-2-аминофенокси-этан-N, N, N, N-тетрауксусной кислоты.

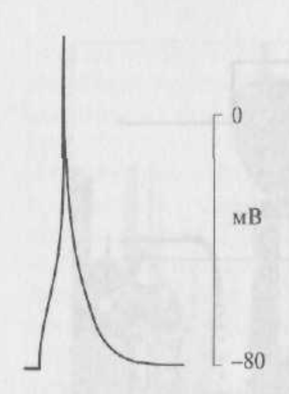


Рис. 7.16. Потенциал действия у изолированного вентрикулярного кардиомиоцита мыши, зарегистрированный методом patch-clamp в режиме current clamp в конфигурации whole-cell

лов, на наш взгляд, не является необходимым. При хорошем выделении клеток они могут «висеть» в конфигурации whole-cell и без Na_2-АТФ в patch-пипетке до 50 мин без каких либо изменений своей электрофизиологии. Если же клетки плохие, их электрофизиологические параметры (например, пиковый Ca^{2+}-ток) линейно меняются (уменьшение пикового Ca^{2+}-тока) в течение 10—15 мин, что представляет собой обычную гибель плохо сваренных клеток, экспериментатор не может оправдывать ситуацию наступлением run-down, тем более что в этом случае присутствие Na_2-АТФ совершенно не улучшает ситуацию. Читатель, планирующий работать с кардиомиоцитами, может для себя заметить, что, по нашему мнению, лучшим тестом качества клеток является введение в перфузионный раствор 10—30 нмоль/л изопротеренола. На этом

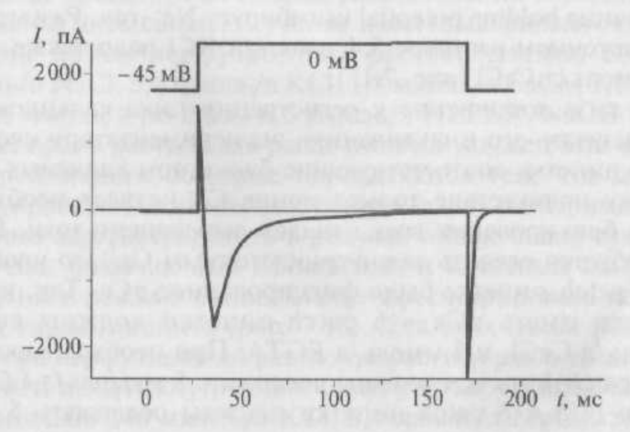


Рис. 7.17. Ca^{2+}-ток вентрикулярного кардиомиоцита мыши, зарегистрированный методом patch-clamp в конфигурации whole-cell, при смещении мембранного потенциала до 0 мВ относительно поддерживаемого потенциала величиной –45 мВ. Na^+-ток подавлен поддерживаемым на уровне –45 мВ потенциалом, а K^+-ток подавлен ионами Cs^+, являющимися блокаторами K^+-каналов

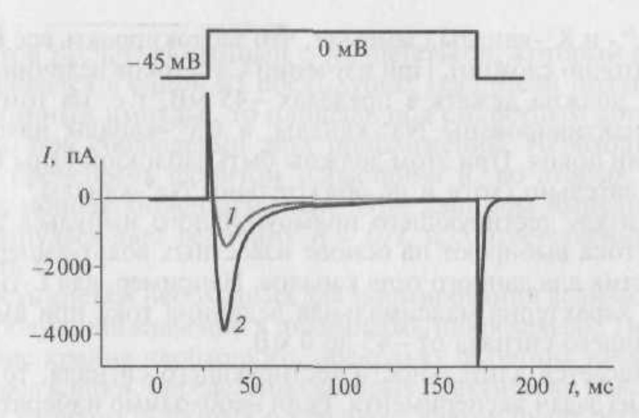


Рис. 7.18. Ca^{2+}-ток вентрикулярного кардиомиоцита мыши, зарегистрированный методом patch-clamp в конфигурации whole-cell, при смещении мембранного потенциала до 0 мВ относительно поддерживаемого потенциала величиной −45 мВ. Na^+-ток подавлен поддерживаемым на уровне −45 мВ потенциалом, а K^+-ток — ионами Cs^+, являющимися блокаторами K^+-каналов (перфузионный раствор и раствор, заполняющий patch-пипетки, такой же как на рис. 7.17):

1 — базальный Ca^{2+}-ток L-типа; *2* — Ca^{2+}-ток L-типа, стимулированный изопротеренолом в концентрации 30 нмоль/л

фоне у хороших клеток наблюдается увеличение Ca^{2+}-тока L-типа не менее чем в 3 раза (рис. 7.18).

7.4.3. Принципы измерений тока в конфигурации whole-cell

После получения конфигурации cell-attached осуществляют компенсацию емкости, устраняя при помощи регулировки емкостные пики. После этого при помощи шприца резко создают отрицательное давление в patch-пипетке, перемещая поршень на 0,3—0,4 мл и тут же снимая шприц. Если разрыва мембраны не происходит, повторяют эту процедуру до получения конфигурации whole-cell.

Используемый для измерения токов алгоритм программы включает в себя следующие идеологические аспекты. Прежде всего holding potential, или поддерживаемый потенциал, устанавливают, исходя из того, какой ток экспериментатор собирается регистрировать. Так, для изучения Na^+-токов величина holding potential должна лежать в тех пределах, когда Na^+-каналы находятся в состоянии покоя; например, для кардиомиоцитов, потенциал покоя которых равен −80 мВ, holding potential должен быть несколько больше, например −85 мВ. При этом должны быть заблокиро-

ваны Ca^{2+}- и K^+-каналы (заметьте, что заблокировать все K^+-каналы достаточно сложно). При изучении Ca^{2+}-токов величина holding potential должна лежать в пределах –45 мВ, т.е. на том уровне, когда инактивированы Na^+-каналы, а Ca^{2+}-каналы находятся в состоянии покоя. При этом должны быть заблокированы K^+-каналы и желательно (хотя и не обязательно) Na^+-каналы.

Амплитуду тестирующего прямоугольного импульса электрического тока выбирают на основе известных вольт-амперных характеристик для данного типа каналов. Например, для L-типа Ca^{2+}-каналов характерна максимальная величина тока при амплитуде тестирующего сигнала от –45 до 0 мВ.

Что касается длительности тестирующего сигнала, то обычно исходят из задач эксперимента. Если необходимо измерять только величину тока по пику, например Ca^{2+}-тока, то длительность прямоугольного импульса электрического тока должна лежать в пределах 140—150 мс. Если необходимо оценить активацию и инактивацию Ca^{2+}-тока, то длительность должна быть значительно большей. Длительность импульса зависит от задачи эксперимента, так же как и внутриклеточный раствор. Существует общее правило: тестирующий импульс должен быть намного больше длительности исследуемого процесса, т.е. если нас интересует время активации, то проводят серию экспериментов, используя различную длительность, определяют время активации и дальнейшие опыты проводят, используя импульсы, скажем, в 3 раза длиннее (обычно как раз в 3 раза длинее и используют!). Частота подачи сигнала определяется как задачами эксперимента, так и длительностью тестирующего импульса и параметрами (временем) выхода из инактивации.

Далее в программу должна быть включена возможность измерения вольт-амперной характеристики клетки. Для этого с шагом 10 мВ, а при приближении к точке пересечения оси абсцисс с осью ординат (т.е. к нулевой точке потенциала и тока) с шагом 5 мВ от величины holding potential должны быть поданы тестирующие импульсы отрицательной полярности до –100 мВ и после этого — тестирующие импульсы положительной полярности до величины +100 мВ.

Наконец, должна быть предусмотрена программа для определения емкости клетки. Для этого от уровня –80 мВ (или несколько большего) на клетку подают тестирующий импульс отрицательной полярности величиной не более 10 мВ (на самом деле точная величина тестирующего импульса не так важна, хотя обычно на клетку подают действительно 10 мВ. Важно, чтобы не активировался ни один ток) и регистрируют площадь емкостных пиков, соответствующих фронту нарастания сигнала (в положительную область) и фронту падения сигнала (в отрицательную область), вычисляя на этой основе емкость клетки. В этом случае использу-

ют простой расчет, связанный с *RC*-цепочкой, который детально рассматривался в одной из предыдущих глав. Если подать достаточно длинный импульс, то площадь под емкостным артефактом равна *RC* при соблюдении двух приближений. Необходимо, во-первых, пренебречь фронтом нарастания и, во-вторых, считать спад как моноэкспоненциальный. При длинном импульсе ток в конце импульса дает величину $R = U/I$, и соответственно можно посчитать *C*.

Емкость клетки необходима для нормирования величины тока, т.е. для получения значений в пикамперах/пикофарадах. Такое нормирование крайне необходимо, поскольку величина тока зависит от размеров клетки, определение которых практически невозможно. Другими словами, у разных по размеру клеток будут регистрироваться разные по величине токи, поэтому проведение статисти-

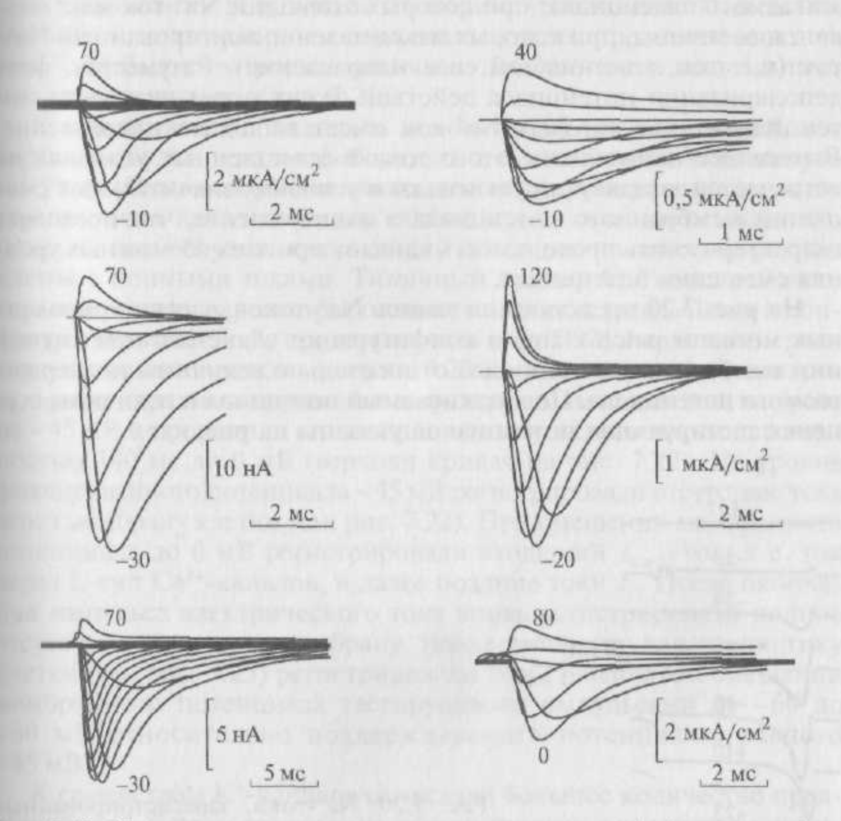


Рис. 7.19. Na^+-токи, зарегистрированные методом patch-clamp в конфигурации whole-cell у разных электровозбудимых клеток при различных величинах смещения мембранного потенциала относительно поддерживаемого потенциала. K^+-каналы были ингибированы Cs, TEA или 4-аминопиридином

ческого анализа практически невозможно. Однако поскольку размеры клетки напрямую связаны с ее емкостью, принято осуществлять нормирование по величине емкости.

В настоящее время известно девять типов Na^+-каналов, которые мы детально будем обсуждать в соответствующей главе. Здесь ограничимся общей информацией, которая позволит нам связать потенциалы действия разных клеток с различными Na^+-токами. На рис. 7.19 продемонстрированы Na^+-токи, зарегистрированные методом patch-clamp в конфигурации whole-cell у ряда электровозбудимых клеток при различных величинах смещения мембранного потенциала относительно поддерживаемого потенциала. Мы не приводим величины поддерживаемых потенциалов, поскольку они различны для клеток разных тканей, однако приводим величины смещений мембранного потенциала относительно поддерживаемого потенциала, при которых входящий Na^+-ток максимален, и величины, при которых максимален инвертированный Na^+-ток (т.е. ток, изменивший свое направление). Разумеется, фаза деполяризации потенциала действия лежит в том диапазоне потенциалов, при которых Na^+-ток имеет входящее направление. Выходящее направление этого тока в естественных условиях не встречается, а присутствует только в условиях значительных смещений мембранного потенциала в эксперименте, что позволяет охарактеризовать проводимость каналов при всех возможных уровнях смещения потенциала.

На рис. 7.20 представлена запись Na^+-токов, зарегистрированных методом patch-clamp в конфигурации whole-cell при смещении мембранного потенциала относительно величины поддерживаемого потенциала. Поддерживаемый потенциал и величины ступенек тестирующих потенциалов указаны на рисунке.

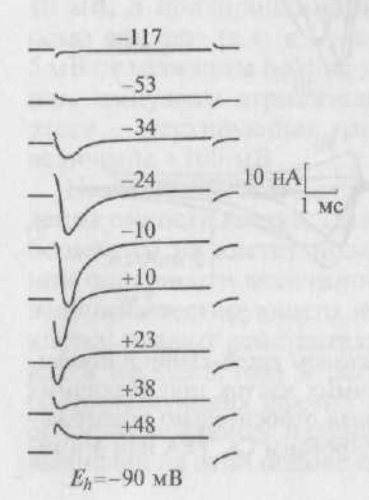


Рис. 7.20. Na^+-токи, зарегистрированные методом patch-clamp в конфигурации whole-cell. Величина поддерживаемого потенциала E_h равна −90 мВ. Величины ступенек тестирующих потенциалов указаны на рисунке

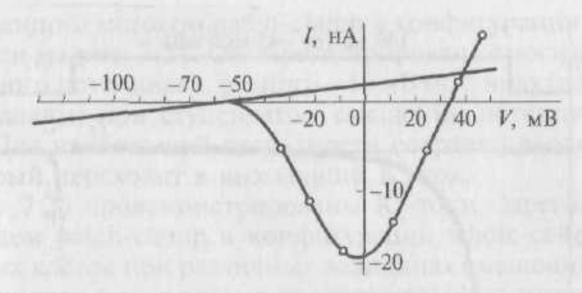


Рис. 7.21. Вольт-амперные характеристики, построенные по пиковым (кружки) и стационарным значениям токов, продемонстрированных на рис. 7.20

На основании результатов экспериментов по пиковым значениям и по стационарным значениям токов, представленных на рис. 7.20, были построены типичные для Na^+-токов вольт-амперные характеристики (рис. 7.21).

К семействам Ca^{2+}-каналов относятся 10 представителей, которые мы будем детально обсуждать в посвященной этим вопросам главе. В данном разделе лишь демонстрируем принципы регистрации этих каналов и даем общие представления о токах, что поможет нам обсудить связь стадий потенциалов действия разных клеток с ионными токами. Типичный пример Ca^{2+}-тока рабочего кардиомиоцита, зарегистрированного методом patch-clamp в конфигурации whole-cell, представлен на рис. 7.22, а вольт-амперная характеристика клетки — на рис. 7.23. Для ее получения у вентрикулярных кардиомиоцитов мыши фиксировали потенциал на уровне −45 мВ и проводили его смещение импульсным током длительностью 140 мс до 0 мВ (верхняя кривая на рис. 7.22). На уровне фиксированного потенциала −45 мВ регистрировали отсутствие тока через мембрану клетки (см. рис. 7.22). При смещении мембранного потенциала до 0 мВ регистрировали входящий $I_{Ca\text{-}L}$-ток, т.е. ток через L-тип Ca^{2+}-каналов, и далее поздние токи I_L. После окончания импульса электрического тока вновь регистрировали полное отсутствие тока через мембрану. Вольт-амперную характеристику клетки (см. рис. 7.23) регистрировали при ступенчатом смещении мембранного потенциала тестируемыми импульсами от −60 до +60 мВ относительно поддерживаемого потенциала, равного −45 мВ.

К семействам K^+-каналов относится большое количество представителей. В этом разделе мы демонстрируем основные принципы, которые заложены в регистрацию каналов этих семейств для лучшего понимания дальнейшего текста. Детальная информация о K^+-каналах будет представлена в соответствующей главе. Типичный пример выходящего K^+-тока рабочего кардиомиоцита, заре-

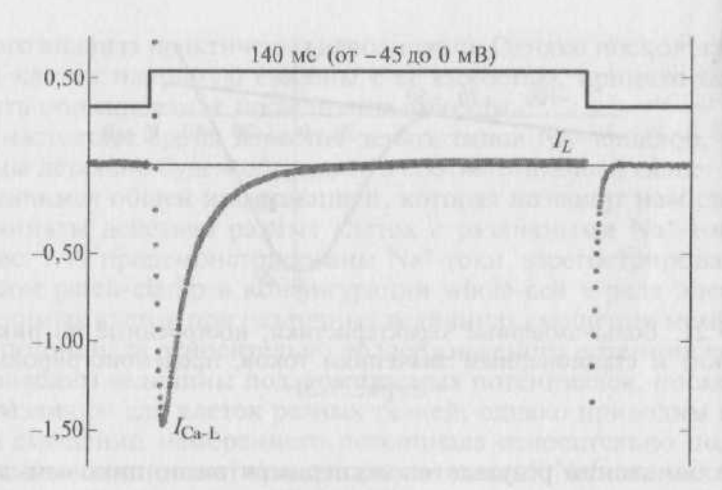


Рис. 7.22. Ca^{2+}-ток вентрикулярного кардиомиоцита, зарегистрированный методом patch-clamp в конфигурации whole-cell, при смещении мембранного потенциала до 0 мВ относительно поддерживаемого потенциала величиной −45 мВ. Na^+-ток подавлен поддерживаемым на уровне −45 мВ потенциалом, а K^+-ток подавлен ионами Cs^+, являющимися блокаторами K^+-каналов. На рисунке представлен также поздний ток (I_L), сохраняющийся после блокады K^+-тока ионами Cs^+

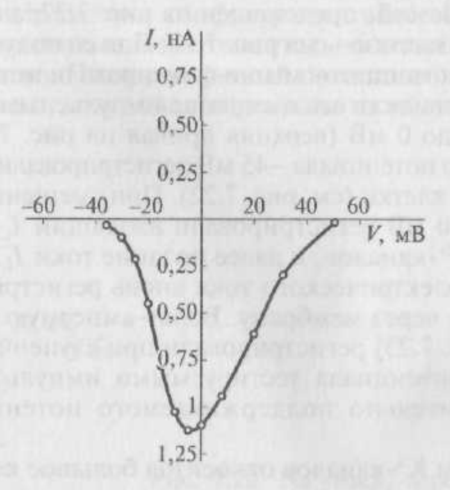


Рис. 7.23. Вольт-амперная характеристика Ca^{2+}-тока вентрикулярного кардиомиоцита при смещении мембранного потенциала от −60 до +60 мВ относительно поддерживаемого потенциала, равного −45 мВ. Рисунок наглядно демонстрирует, что максимальный Ca^{2+}-ток возникает при потенциале, лежащем около 0 мВ

гистрированного методом patch-clamp в конфигурации whole-cell, представлен на рис. 7.24. Он зарегистрирован относительно поддерживаемого потенциала, равного –45 мВ (что инактивирует Na^+-ионные каналы) при ступенчатом смещении потенциала от –45 до 0 мВ. Для наибольшей наглядности сохранен входящий Ca^{2+}-ток, который переходит в выходящий K^+-ток.

На рис. 7.25 продемонстрированы K^+-токи, зарегистрированные методом patch-clamp в конфигурации whole-cell у электровозбудимых клеток при различных величинах смещения мембранного потенциала относительно поддерживаемого потенциала. Мы не приводим величины поддерживаемых потенциалов, поскольку они разные для клеток разных тканей.

На рис. 7.26 представлена вольт-амперная характеристика K^+-тока рабочего кардиомиоцита при смещении мембранного потенциала от –90 до +90 мВ относительно поддерживаемого потенциала, равного –45 мВ. Пересечение вольт-амперной кривой с осью потенциала (на уровне –80 мВ) характеризует величину потенциала покоя клетки, поскольку измерения K^+-тока происходят в стандартных внеклеточной и внутриклеточной средах. Иначе говоря, ионы K^+ присутствовали и в перфузионном растворе, и в patch-пипетке.

Таким образом, мы рассмотрели принципы регистрации оригинальных кривых в ответ на тестирующий потенциал, смещаю-

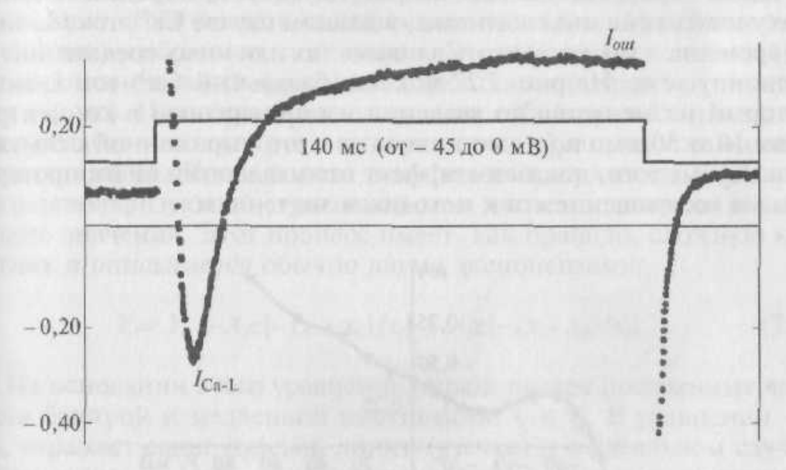


Рис. 7.24. Выходящий K^+-ток вентрикулярного кардиомиоцита, зарегистрированный методом patch-clamp в конфигурации whole-cell при смещении мембранного потенциала до 0 мВ относительно поддерживаемого потенциала величиной –45 мВ. Na^+-ток подавлен поддерживаемым на уровне –45 мВ потенциалом. Ca^{2+}-каналы не были блокированы, поэтому на рисунке представлен и входящий Ca^{2+}-ток, который переходит в выходящий K^+-ток

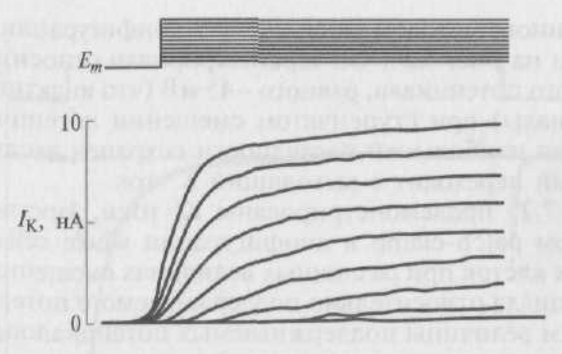


Рис. 7.25. K^+-ток, зарегистрированный при смещении мембранного потенциала ступенчатыми импульсами относительно поддерживаемого потенциала. Na^+- и Ca^{2+}-токи подавлены

щий потенциал мембраны относительно поддерживаемого потенциала на ту или иную величину, и принципы построения вольт-амперной характеристики клетки, когда тестируемые потенциалы подаются на клетку максимально в диапазоне от −100 до +100 мВ.

Еще один способ оценки величины изменения тока от времени — регистрация так называемого time course (рис. 7.27). Этим методом обработки данных по рисунку можно определить динамику изменения пикового тока, в данном случае Ca^{2+}-тока L-типа во времени, а также оценить влияние тех или иных соединений на величину тока. На рис. 7.27 показан базальный Ca^{2+}-ток L-типа, который не меняется до введения изопротеренола в концентрациях 10 и 50 нмоль/л, что приводит к его выраженной стимуляции. Кроме того, показаны эффект отмыва клетки от изопротеренола и возвращение его к исходным значениям.

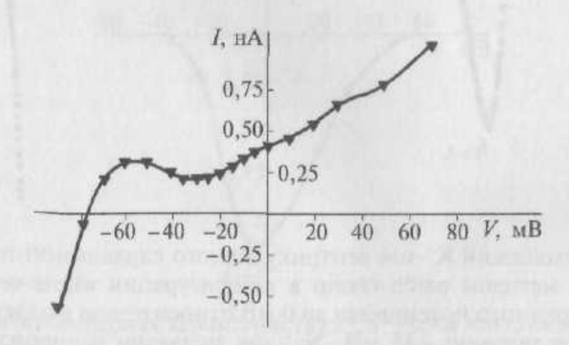


Рис. 7.26. Вольт-амперная характеристика K^+-тока рабочего кардиомиоцита при смещении мембранного потенциала от −90 до +90 мВ относительно поддерживаемого потенциала, равного −45 мВ

Рис. 7.27. Способ оценки изменения величины тока от времени (time course). Представлено изменение во времени пикового Ca^{2+}-тока L-типа. Базальный Ca^{2+}-ток L-типа не меняется до введения изопротеренола в концентрациях 10 и 50 нмоль/л, что приводит к его выраженной стимуляции. Отмыв клетки от изопротеренола полностью возвращает величину тока к исходным значениям

Еще два параметра, характеризующих работу потенциалуправляемых каналов, — это их активация и инактивация. Активация потенциалуправляемых каналов, которая происходит только под влиянием изменения трансмембранного электрического потенциала, является их характерной чертой. Особенностью Ca^{2+}-токов по сравнению с Na^{+}-токами является их медленное нарастание при смещении мембранного потенциала. Этот процесс описывают моноэкспоненциальной функцией с постоянной времени активации (τ_a, мс). Инактивация представляет собой процесс постепенного ослабления ионного тока через канал при продолжающейся деполяризации. Проявлением инактивации служит спад вызванного деполяризующей ступенькой тока после достижения им пикового значения. Этот процесс имеет, как правило, сложную кинетику *и описывается обычно двумя экспонентами:*

$$Y = Y_0 + A_1 e[-(x - x_0)/\tau_f] + A_2 e[-(x - x_0)/\tau_s]. \quad (7.3)$$

На основании этого уравнения определяются постоянные времени быстрой и медленной инативации: τ_f и τ_s. В уравнении Y_0, пА, отражает сдвиг нулевой линии (утечка) и в идеальном случае равен нулю; X_0, мс, — время приложения деполяризирующего стимула, A_1, пА, — часть амплитуды тока, инактивирующаяся путем быстрой инактивации (τ_f); A_2, пА, — часть амплитуды тока, инактивирующаяся путем медленной инактивации (τ_s). Необходимо отметить, что максимальная амплитуда тока (I_{max}) является суммой A_1 и A_2. Поскольку максимальная амплитуда зависит от многих параметров, в частности от типа клетки, плотности Ca^{2+}-кана-

лов, A_1 и A_2 часто нормализируют на максимальное значение тока (A_1/I_{max} и A_2/I_{max}) и выражают в процентах (рис. 7.28, 7.29).

Рассмотрим эти вопросы подробнее. На рис. 7.28, *а* показаны базальный ток и его активация и инактивация под действием изопротеренола у изолированных вентрикулярных кардиомиоцитов контрольных крыс; на рис. 7.28, *б* также показаны базальный ток и его активация и инактивация под действием изопротеренола, но у изолированных вентрикулярных кардиомиоцитов трансгенных крыс (SERCA2 overexpressing cardiomyocytes). В таких случаях обычно анализируется фаза инактивации Ca^{2+}-тока.

Выведем отдельно фазы инактивации Ca^{2+}-тока, пока еще не нормируя данные на рис. 7.29, *а* для контрольных животных и на рис. 7.29, *б* для трансгенных, и представим в соответствии с описанным принципом часть данных Y_0, X_0 (пА), A_1 и A_2 (%) в табл. 7.1. Далее A_1 и A_2 нормализуем на максимальное значение тока (A_1/I_{max} и A_2/I_{max}) и проведем расчет данных τ_f и τ_s (мс), которые представим в табл. 7.1. Таким образом, табл. 7.1 будет иметь законченный вид, а совмещение нормализованных кривых инактивации, представленное на рис. 7.29, *в*, с учетом величины стандартной девиации продемонстрирует нам, что β-адренергическая стимуляция клеток контрольных и трансгенных животных полностью устраняет исходную разницу в инактивационной кинетике.

Корректное описание инактивации Ca^{2+}-токов представляет определенные сложности, поскольку этот процесс развивается во времени параллельно с развитием выходящих K^+-токов. Поэтому регистрируемый спад Ca^{2+}-тока может быть не истинным, а определяться наложением на Ca^{2+}-ток одновременно развивающихся выходящих K^+-токов. Для предотвращения подобных ошибок не-

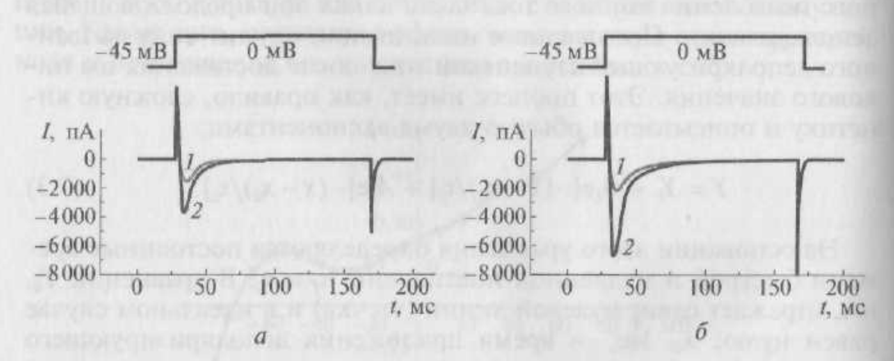


Рис. 7.28. Влияние изопротеренола в концентрации 50 нмоль/л на базальный Ca^{2+}-ток L-типа:

а — у изолированных вентрикулярных кардиомиоцитов контрольных и трансгенных крыс; *б* — у изолированных вентрикулярных кардиомиоцитов трансгенных крыс (SERCA2 overexpressing cardiomyocytes); *1* — базальный ток; *2* — действие изопротеренола

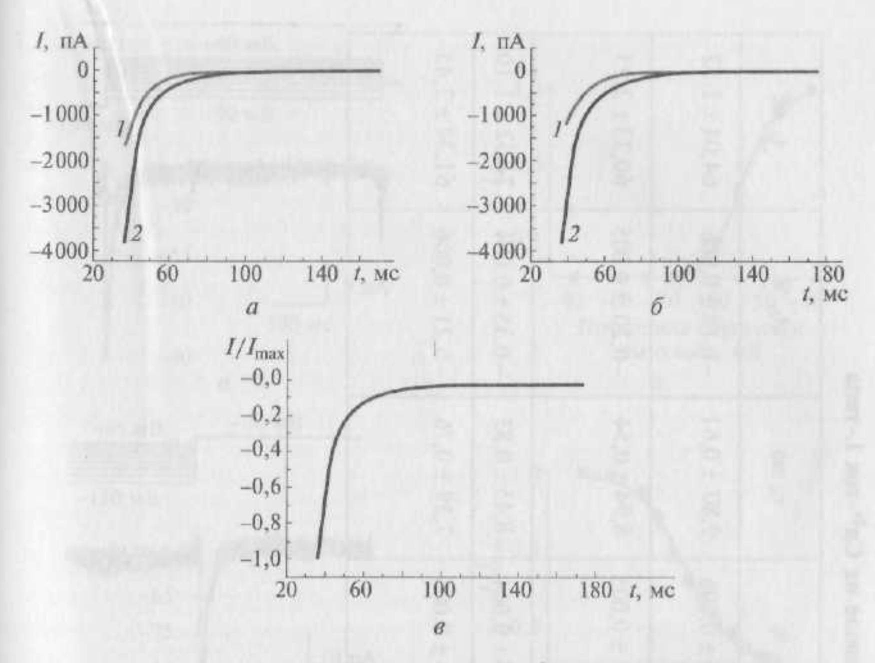


Рис. 7.29. Фазы инактивации Ca^{2+}-тока L-типа:

а — ненормализованная инактивация Ca^{2+}-тока L-типа вентрикулярных кардиомиоцитов контрольных крыс; *б* — ненормализованная инактивация Ca^{2+}-тока L-типа вентрикулярных кардиомиоцитов трансгенных крыс (SERCA2 overexpressing cardiomyocytes); *1* — до введения в перфузионный раствор изопротеренола в концентрации 50 нмоль/л; *2* — после введения; *в* — совмещение нормализованных кривых инактивации Ca^{2+}-тока L-типа после аппликации изопротеренола у вентрикулярных кардиомиоцитов контрольных и трансгенных крыс

обходимо тщательно блокировать K^+-токи. Их наличие в наиболее простой форме можно определить по амплитуде Ca^{2+}-тока в конце достаточно длинного по времени стимула. В этом случае она будет слегка превышать «нулевую» линию ($Y_0 > 0$). Здесь следует отметить, что превышение «нулевой» линии в конце стимула может также отражать очень медленную (константа времени значительно больше длительности стимула) инактивацию исследуемого Ca^{2+}-тока. Поэтому чтобы избежать возможных ошибок, сложный динамический процесс инактивации сводят к стационарной (steady-state) инактивации.

В этом случае измеряют уменьшение максимальной величины тока, вызванного тестирующими деполяризующими ступеньками в случае, если перед этим мембранный потенциал определенное (достаточно длинное по сравнению с длительностью инактивации) время поддерживался на сниженном уровне. Зависимость этого уменьшения от величины поддерживаемого потенциала носит S-образную форму. При этом для характеристики Ca^{2+}-кана-

Таблица 7.1. **Влияние изопротеренола на Ca^{2+}-ток L-типа**

Крыса	Ca^{2+}-ток L-типа	Y_0, пА	X_0, пА	A_1, %	τ_f, мс	A_2, %	τ_f, мс
Контрольная	Базальный	0	–1 612 ± 55	–0,82 ± 0,006	9,80 ± 0,61	–0,18 ± 0,006	64,04 ± 1,52
	Стимулированный изопротеронолом	0	–3 760 ± 68	–0,80 ± 0,005	8,94 ± 0,54	–0,20 ± 0,005	60,33 ± 2,23
Трансгенная	Базальный	0	–1 985 ± 48	–0,65 ± 0,004	8,45 ± 0,83	–0,35 ± 0,004	74,32 ± 1,10
	Стимулированный изопротеронолом	0	–6 511 ± 79	–0,79 ± 0,006	7,39 ± 0,76	–0,21 ± 0,006	61,34 ± 2,45

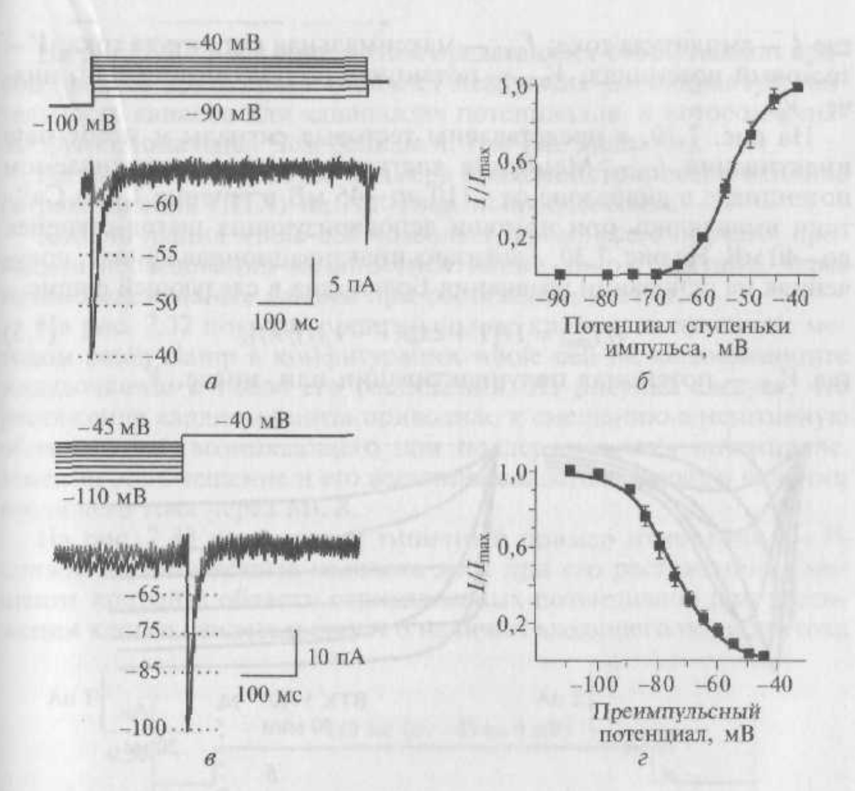


Рис. 7.30. Принципы регистрации и анализа активации и инактивации $I_{Ca\text{-}T}$ тока на примере Ca_V3-каналов:

а — тестовые сигналы и steady-state-активация $I_{Ca\text{-}T}$; *б* — кривая активации; *в* — тестовые сигналы и steady-state-инактивация $I_{Ca\text{-}T}$; *г* — кривая инактивации

лов, помимо амплитуды кальциевого тока (I_{Ca}), обычно рассматривается величина активации (V_a) и величина инактивации (V_h). Если сущность постоянных времени активации и инактивации Ca^{2+}-каналов достаточно понятна, то величины активации и инактивации требуют пояснения.

На рис. 7.30 показаны принципы исследования активации и инактивации на примере $I_{Ca\text{-}T}$-тока. На рис. 7.30, *а* представлены тестовые сигналы и steady-state-активация $I_{Ca\text{-}T}$. Мембрана клетки была на поддерживаемом потенциале −100 мВ в течение 1 с, а Ca^{2+}-токи выявлялись при помощи деполяризующих шагов-ступенек.

На рис. 7.30, *б* показана активационная кривая, полученная на основании уравнения Больцмана в следующей форме:

$$I/I_{max} = 1/[1 + \exp(-(V - V_{0,5})/k)], \qquad (7.4)$$

где I — амплитуда тока; I_{max} — максимальная амплитуда тока; V — тестовый потенциал; $V_{0,5}$ — потенциал полуактивации или, иначе, V_a.

На рис. 7.30, *в* представлены тестовые сигналы и steady-state инактивация $I_{Ca\text{-}T}$. Мембрана клетки была на поддерживаемом потенциале в диапазоне от –110 до –45 мВ в течение 1 с, а Ca^{2+}-токи выявлялись при помощи деполяризующих шагов-ступенек до –40 мВ. На рис. 7.30, *г* показана инактивационная кривая, полученная на основании уравнения Больцмана в следующей форме:

$$I/I_{max} = 1/[1 + \exp(V - V_{0,5})/k)], \qquad (7.5)$$

где $V_{0,5}$ — потенциал полуинактивации или, иначе, V_h.

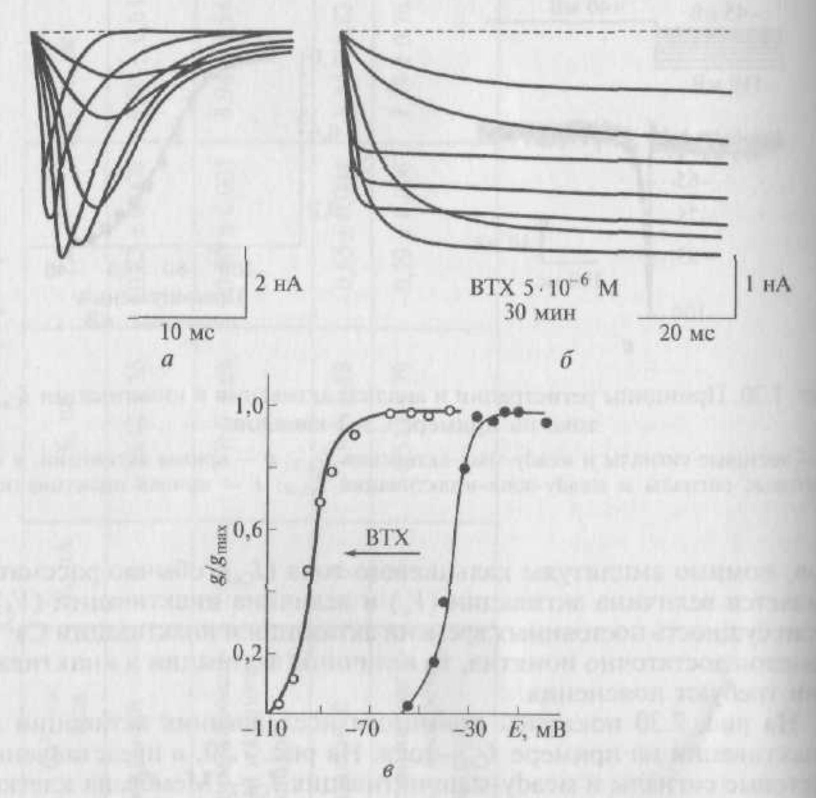


Рис. 7.31. Влияние батрахотоксина на Na^+-токи нейробластомы:

а — регистрация Na^+-токов различной величины тестовых потенциалов (–45, –40, –35, –20, +15 мВ) относительно поддерживаемого потенциала величиной –100 мВ; *б* — регистрация Na^+-токов различной величины тестовых потенциалов (-90, –85, –75, –65, –40, –35, –25 мВ) относительно поддерживаемого потенциала величиной –110 мВ через 30 мин после применения ВТХ в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М; *в* — активационная кривая, полученная на основании уравнения Больцмана после введения ВТХ смещена влево в сторону гиперполяризации на 50 мВ

На рис. 7.30, *б* и *г* константа *k* представляет собой наклон кривой (фактор крутизны) и отражает steady-state-потенциалчувствительность каналов или «диапазон» потенциалов, в котором каналы функциональны. Чем больше *k*, тем у́же диапазон.

На рис. 7.31 в качестве примера продемонстрировано влияние батрахотоксина (ВТХ) на Na^+-токи нейробластомы.

Конфигурация whole-cell позволяет, кроме всего прочего, проводить исследования механосенситивных токов, текущих через механосенситивные каналы при растяжении клетки.

На рис. 7.32 показаны оригинальные кривые, полученные методом patch-clamp в конфигурации whole-cell на кардиомиоците желудочка до и после его растяжения. Из рисунка следует, что растяжение кардиомиоцита приводило к смещению в негативную область тока, возникающего при поддерживаемом потенциале. Именно это смещение и его величина свидетельствуют о наличии входящего тока через МСК.

На рис. 7.33 представлен типичный пример изменения *I*—*V*-кривой кардиомиоцита человека до и при его растяжении. Смещение кривой в области отрицательных потенциалов при растяжении клетки свидетельствует о наличии входящего ионного тока

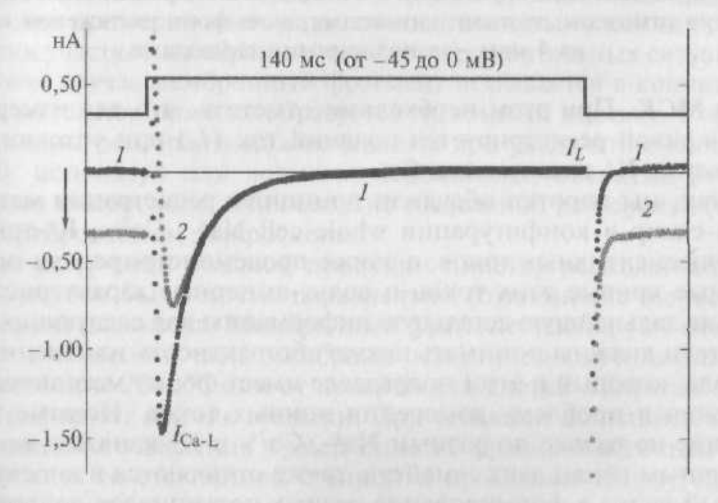


Рис. 7.32. Оригинальные кривые, полученные методом patch-clamp в конфигурации whole-cell на кардиомиоците левого желудочка морской свинки до (кривая *1*) и после его растяжения (кривая *2*). Смещение тока при поддерживаемом потенциале в результате растяжения клетки и открытия механосенситивных каналов показано стрелкой. На рисунке представлен L-тип Ca^{2+}-тока и поздний ток (I_L), причем компонент K^+-тока в позднем токе подавлен ионами Cs. Na^+-ток подавлен поддерживаемым на уровне –45 мВ потенциалом. Мембранный потенциал смещался от уровня поддерживаемого потенциала (–45 мВ) до 0 мВ

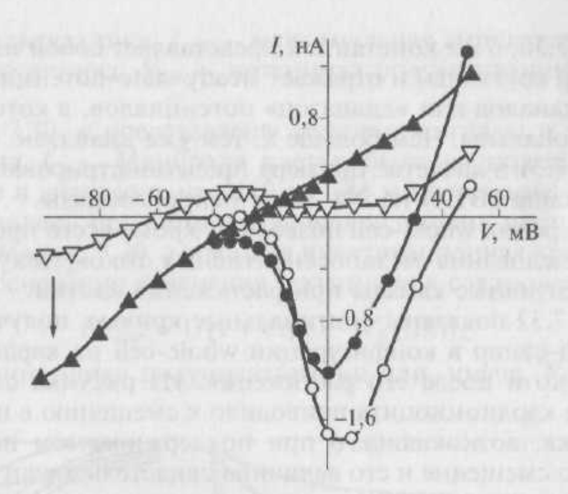


Рис. 7.33. Активация неселективного катионного тока при растяжении на 4 мкм кардиомиоцита левого желудочка человека после инфаркта миокарда в условиях подавленного цезием калиевого тока. I—V-кривые поздних токов, измеренных в конце 140 мс импульса (I_L отмечены треугольниками), I—V-кривые, характеризующие работу L-типа Ca^{2+}-каналов ($I_{Ca\text{-}L}$ — отмечены кружками). I—V-кривые мембранных токов до растяжения отмечены пустыми символами, а на фоне растяжения клетки на 4 мкм — заполненными символами

через МСК. При этом необходимо отметить, что для измерения I—V-кривой регистрируется поздний ток (I_L) при условии блокирования K^+-тока ионами Cs^+.

Итак, мы коротко обсудили принципы регистрации методом patch-clamp в конфигурации whole-cell Na^+-, Ca^{2+}-, K^+-токов и механосенситивных токов, а также продемонстрировали оригинальные кривые этих токов и вольт-амперные характеристики, оставив дальнейшую детальную информацию для следующих глав. Читатели должны понимать некую абстрактность изложения материала, который в этом подразделе имеет форму методического введения в проблему измерения ионных токов. Ионные токи, текущие не только по разным Na^+-, Ca^{2+}- и K^+-каналам, но и по различным типам этих семейств, также отличаются и вносят различный вклад в формирование разных потенциалов действия.

7.4.4. Принципы измерений тока, протекающего через одиночные каналы

В какой бы конфигурации мы ни регистрировали канальные токи, прежде всего необходимо рассмотреть вопрос о величине фрагмента мембраны, который находится под patch-пипеткой. Это

особенно важно при изучении реагирующих на изменение давления механосенситивных каналов, но этот вопрос мы рассмотрим отдельно в соответствующей главе.

После спонтанного получения гигаомного контакта без подсасывания при визуальном рассмотрении кончика patch-пипетки и поверхности клеточной мембраны при большом увеличении (×1 200) не наблюдается деформации клеточной мембраны под patch-пипеткой. Площадь электрически изолированного пипеткой мембранного фрагмента, по-видимому, примерно равна площади отверстия кончика. Область контакта мембрана — стекло формируется, вероятно, только торцом кончика patch-пипетки. В этом случае площадь фрагмента мембраны можно оценить по значению сопротивления patch-пипетки до образования контакта. В большинстве случаев, однако, контакт формируется только при небольшом отрицательном давлении, создаваемом внутри patch-пипетки. При этом часть клеточной мембраны втягивается внутрь кончика пипетки, принимая Ω-образную форму. Такую деформацию во время установления гигаомного контакта можно наблюдать даже в световой микроскоп и затем оценивать площадь мембранного фрагмента в кончике patch-пипетки. Подробно этот вопрос будет рассматриваться в главе, посвященной механосенситивным ионным каналам.

Можно примерно оценивать площадь втянутых в кончик patch-пипетки участков мембраны в двух экспериментальных ситуациях. В первом случае мембранный фрагмент втягивается в кончик пипетки до тех пор, пока не образуется гигаомный контакт. Степень деформации мембраны можно оценить при увеличении ×500 или ×1 250, используя или водно-иммерсионный объектив (×40) в обычном микроскопе, или объектив с масляной иммерсией (×100) в инвертированном микроскопе.

При получении боковой проекции пипетку располагают так, чтобы ее ось была почти параллельна (отклонение менее 10°) фокальной плоскости. Мембранный фрагмент изолируют механически от остальной части мембраны отведением кончика пипетки на расстояние 20 — 50 мкм от поверхности клетки и на этом этапе фотографируют кончик пипетки. При создании дополнительного отрицательного давления в patch-пипетке фрагмент перестает контактировать со стеклянной стенкой и принимает форму сферического пузырька (везикулы), который перемещался в кончике вверх и вниз. Прикладывая небольшое положительное давление (менее 5 см вод. ст.), пузырек вводят в самый кончик пипетки и фотографируют. С помощью таких микрофотографий определяют площадь мембранных фрагментов, втянутых в кончик пипетки при образовании гигаомного контакта. При стандартном сопротивлении patch-пипетки можно оценить площадь фрагмента в Ω-образной конфигурации (т. е. когда мембранный фрагмент находится в контакте со стенкой пипетки) и после образования везикулы.

Площадь мембраны в Ω-образной конфигурации можно оценить, если представить фрагмент в виде конуса, имеющего определенную площадь взаимодействия со стеклом, и полусферы, обращенной к раствору в patch-пипетке. В везикулярной конфигурации площадь фрагмента оценивают по величине его кажущегося диаметра. В Ω-образной конфигурации отношение площади полусферы к площади мембраны, контактирующей со стеклом, составляло 0,5—0,6. Значения общей площади мембраны в двух конфигурациях — Ω-образной и везикулярной — почти одинаковы. Поскольку площадь везикулы можно оценить точнее, измерения лучше выполнять на этой конфигурации. Средняя площадь мембранных фрагментов, изолированных пипетками с сопротивлением 2,5 МОм и исследованных в везикулярной конфигурации, составляла в среднем 14 мкм². Предполагая, что эти фрагменты имеют геометрическую форму, изображенную на рис. 7.34 (т.е. отношение площади полусферы к площади мембраны, контактиру-

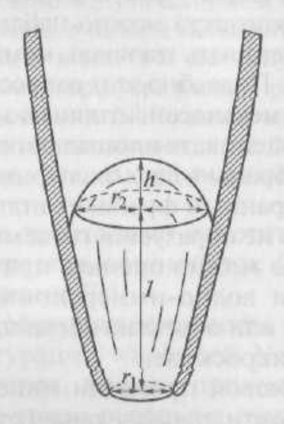


Рис. 7.34. Геометрия механически изолированных фрагментов мембраны клетки в кончике patch-пипетки, имеющей сопротивление 2 МОм Ω-образной везикулы. Измеренное расстояние от отверстия пипетки до вершины везикулы ($l + h$) составляет 3,75 мкм. Расстояние от отверстия до основания сферической части равно 3 мкм. Высота сферической части h равна 0,75 мкм; r_2 = 1,25 мкм, r_1 = 0,5 мкм. Отсюда получаем площадь свободной части мембраны $A_C = \pi(h^2 + 2r_2^2)$ = 11 мкм². Площадь взаимодействия со стеклом части мембраны составляет $A_B = \pi l(r_2 + r_1)$ = 17 мкм². Предположив, что отверстие кончика также закрыто мембраной, получим общую площадь мембраны 29 мкм². Зная площадь контактной части мембраны (17 мкм²) и сопротивление пипетки при контакте с мембраной (2 ГОм), можно оценить степень контактирования клеточной мембраны и стенки patch-пипетки. Полагая, что для 150 ммоль/л раствора KCl удельное сопротивление равно 51 Ом · см, а ионы K^+ и Cl^- перемещаются свободно, получим расстояние между мембраной и стеклом менее 1 Å

ющей со стеклом, составляет 0,5), получим площадь полусферы мембраны порядка 5 мкм^2.

Теперь перейдем непосредственно к принципам регистрации одиночных ионных каналов, которая осуществляется в режиме voltage clamp. Уже создав конфигурацию cell-attached или конфигурации inside-out patch и outside-out patch, при достаточно высоком значении cell-attached и величине усиления усилителя можно зарегистрировать одиночные ионные каналы, расположенные под пипеткой. Основной принцип регистрации того или иного типа одиночного ионного канала заключается в том, что экспериментатор должен иметь информацию о величине поддерживаемого потенциала для этого типа канала, об амплитуде тестируемого потенциала относительно поддерживаемого потенциала, при которой этот канал активируется. Рассмотрим несколько примеров регистрации некоторых одиночных Na^+-, Ca^{2+}- и K^+-каналов.

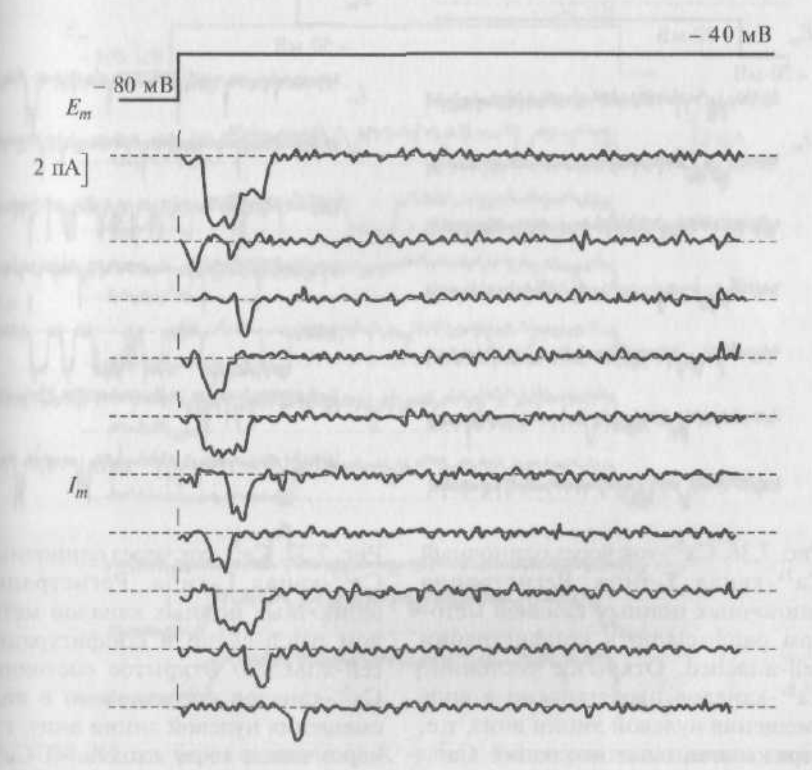
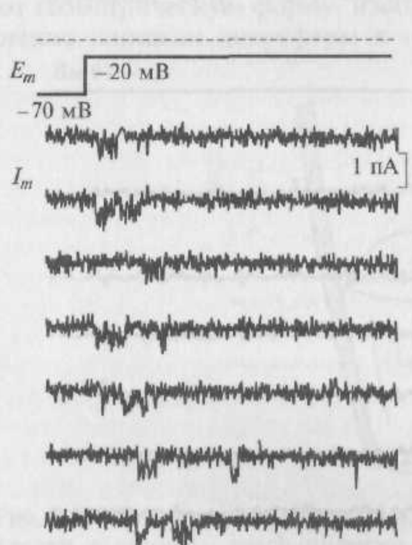


Рис. 7.35. Na^+-ток через одиночный Na^+-канал в мышечной клетке мыши. Регистрация методом patch-clamp в конфигурации cell-attached одиночных ионных каналов при смещениях мембранного потенциала от –80 до –40 мВ. Открытое состояние Na^+-каналов представлено в виде смещения нулевой линии вниз, т.е. через канал течет входящий Na^+-ток

На рис. 7.35 показаны одиночные Na^+-каналы, зарегистрированные методом patch-clamp в конфигурации cell-attached. Ток через канал возникает при смещениях мембранного потенциала от −80 мВ (поддерживаемый потенциал) до −40 мВ. Открытое состояние Na^+-каналов характеризуется смещением нулевой линии вниз, и это свидетельствует о том, что через канал течет входящий Na^+-ток.

На рис. 7.36 продемонстрированы одиночные Ca^{2+}-каналы T-типа, а на рис. 7.37 — одиночные Ca^{2+}-каналы L-типа. В обоих случаях открытое состояние Ca^{2+}-каналов представлено в виде смещения нулевой линии вниз, т.е. через канал течет входящий Ca^{2+}-ток. Однако для регистрации Ca^{2+}-канала T-типа смещение мембранного потенциала проводится до −20 мВ относительно поддер-



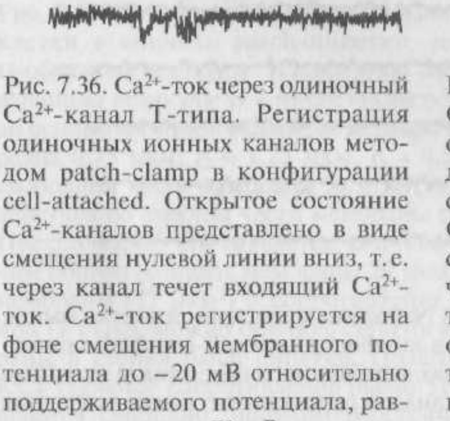


Рис. 7.36. Ca^{2+}-ток через одиночный Ca^{2+}-канал T-типа. Регистрация одиночных ионных каналов методом patch-clamp в конфигурации cell-attached. Открытое состояние Ca^{2+}-каналов представлено в виде смещения нулевой линии вниз, т.е. через канал течет входящий Ca^{2+}-ток. Ca^{2+}-ток регистрируется на фоне смещения мембранного потенциала до −20 мВ относительно поддерживаемого потенциала, равного −70 мВ

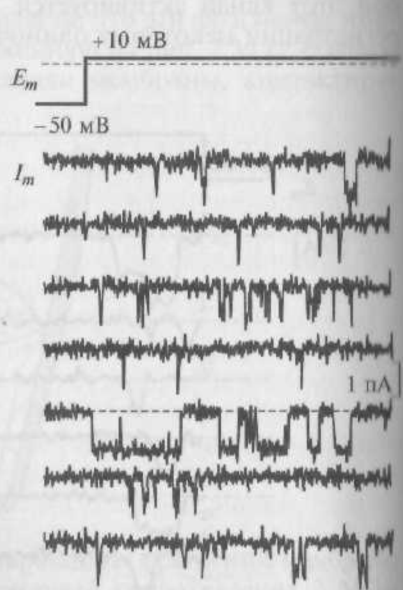


Рис. 7.37. Ca^{2+}-ток через одиночный Ca^{2+}-канал L-типа. Регистрация одиночных ионных каналов методом patch-clamp в конфигурации cell-attached. Открытое состояние Ca^{2+}-каналов представлено в виде смещения нулевой линии вниз, т.е. через канал течет входящий Ca^{2+}-ток. Ca^{2+}-ток регистрируется на фоне смещения мембранного потенциала до +10 мВ относительно поддерживаемого потенциала, равного −50 мВ

живаемого потенциала, равного −70 мВ, а для регистрации Ca^{2+}-канала L-типа смещение мембранного потенциала проводят до +10 мВ относительно поддерживаемого потенциала, равного −50 мВ.

На рис. 7.38 представлены одиночные K^+-каналы, зарегистрированные методом patch-clamp в конфигурации cell-attached. В этом случае открытое состояние K^+-каналов представлено в виде смещения нулевой линии вверх, т.е. через канал течет выходящий K^+-ток. Этот ток регистрируется на фоне смещения мембранного потенциала до +50 мВ относительно поддерживаемого потенциала, равного −100 мВ.

Хотя ток, текущий через каналы, как это показано на рис. 7.35—7.38, регистрируется и представлен в амперах, обычно после обработки обсуждается проводимость одиночных каналов и используются сименсы. Это связано с тем, что амплитуда тока определя-

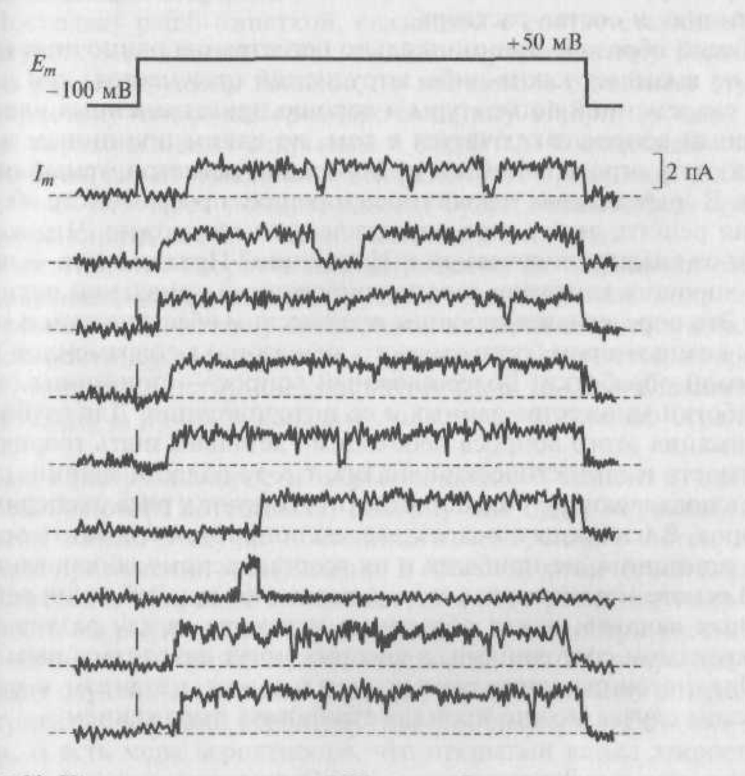


Рис. 7.38. K^+-ток через одиночный K^+-канал. Регистрация одиночных ионных каналов методом patch-clamp в конфигурации cell-attached. Открытое состояние K^+-каналов представлено в виде смещения нулевой линии вверх, т.е. через канал течет выходящий K^+-ток. K^+-ток регистрируется на фоне смещения мембранного потенциала до +50 мВ относительно поддерживаемого потенциала, равного −100 мВ

ется не как электрическая, а как электрохимическая разность потенциала, т.е. $I = (U_m - U_{rev})/R$ (измеряется в пикоамперах). Поскольку после изобретения метода диализа клеток появилась возможность менять как потенциал, так и среду внутри и снаружи клетки, то измеренный ток отражает как изменение потенциала на мембране U_m, так и потенциала реверсии U_{rev}. Чтобы не заставлять читателя следить за потенциалом реверсии, т.е. смотреть растворы и постоянно помнить, какие ионы и в каких количествах находятся снаружи и внутри, применили понятие «проводимость». Таким образом, экспериментатор сам должен посчитать электрохимическую разность потенциалов и поделить измеренный ток на нее. Это имеет смысл для каналов с линейной вольт-амперной характеристикой, так как дает параметр, не зависящий от условий эксперимента. Для «сложных» потенциалзависимых каналов (например, кальциевых) все равно дополнительно указывают потенциал и состав раствора.

Таким образом, принципиально регистрация одиночных каналов не вызывает каких-либо затруднений (разумеется, при наличии современной аппаратуры и хорошо приготовленных клеток). Главный вопрос заключается в том, по каким принципам и как обработать огромный объем информации, регистрируемый от канала. В современных условиях без хорошего программного обеспечения решить этот вопрос практически невозможно. Что же мы ждем от анализа получаемой информации? Прежде всего — наличия хороших картинок зарегистрированной канальной активности. Это определяется хорошим техническим обеспечением и хорошим компьютером (гигагерцевого диапазона) с современной программой обработки. Более сложный вопрос — принципы самой обработки множества данных и ее интерпретация. Для глубокого понимания этого вопроса необходимо детально знать теорию вероятности и статистический анализ, т.е. те области знаний, которые в подавляющем большинстве отсутствуют у ряда экспериментаторов. В настоящем подразделе мы попробуем изложить основные принципы, не прибегая к их теоретическому обоснованию.

В основе механизмов, которые исследуют при описании работы ионных каналов, лежат обратимые переходы между различными дискретными состояниями, в которых могут находиться каналы.

Для потенциалуправляемых каналов этот механизм в самом простом случае можно проиллюстрировать выражением:

$$\begin{matrix}\text{Закрытое}\\ \text{состояние}\\ \text{канала}\end{matrix} \underset{\alpha}{\overset{\beta'}{\rightleftarrows}} \begin{matrix}\text{Открытое}\\ \text{состояние}\\ \text{канала}\end{matrix}, \qquad (7.6)$$

где α — константа скорости закрытия канала; β' — константа скорости открытия канала.

Рядом со стрелкой, изображающей данный переход, ставят константу скорости перехода. В приведенном случае существуют только два состояния канала.

Если речь идет о лигандуправляемых каналах, то для их активации необходимо связывание лиганда и рецептора, поэтому у канала будет три дискретных состояния:

$$\begin{matrix}\text{Закрытое} \\ \text{состояние} \\ \text{канала}\end{matrix} \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftarrows}} \begin{matrix}\text{Закрытое} \\ \text{состояние} \\ \text{канала} \\ \text{(связывание)}\end{matrix} \underset{\alpha}{\overset{\beta}{\rightleftarrows}} \begin{matrix}\text{Открытое} \\ \text{состояние} \\ \text{канала}\end{matrix},$$

где k — число состояний системы.

В этом случае канал будет иметь два дискретных закрытых состояния и одно открытое.

Поскольку patch-пипеткой, связанной с соответствующей аппаратурой, мы измеряем какую-либо характеристику большого числа регистрируемых каналов, то мы можем оценивать эту характеристику только как среднюю величину. Например, если скорости перехода между открытым и закрытым состоянием канала постоянны, т.е. не изменяются во времени, то временной ход среднего тока $I(t)$ через ионные каналы будет описываться суммой $k - 1$ экспонент, где k — число состояний системы.

Известно, что скорость любой реакции на основании закона действующих масс пропорциональна произведению концентраций реагентов. Константу пропорциональности называют константой скорости, причем полагают, что она не изменяется во времени, т.е. является истинной константой (α, β, k_{+1}, k_{-1}). Однако применительно к ионным каналам существует несколько ограничений.

Так, константа скорости закрытия канала α зависит от величины мембранного потенциала, поэтому она будет истинной константой только в случае постоянного мембранного потенциала, т.е. при применении voltage clamp. В обычной химической кинетике константа скорости описывает скорость реакции, например скорость закрытия канала (константа α), однако при рассмотрении одиночного канала нужно учитывать, что это закрытие происходит случайным образом, поэтому ту же константу α надо рассматривать с позиций вероятностных соображений. Другими словами, α есть мера вероятности, что открытый канал закроется в течение единицы времени, однако константа α имеет размерность [$с^{-1}$]; следовательно, это не просто безразмерная вероятность.

Прежде всего нас интересует тот отрезок времени, в течение которого канал будет находиться в том или ином состоянии. Эти отрезки времени являются случайными переменными, и характер их вариации описывается вероятностным распределением. Время

представляет собой непрерывную переменную, поэтому необходимо искать функцию плотности вероятности, например для времени жизни канала в открытом или закрытом состоянии. Эта функция $f(t)$ определяется таким образом, что площадь под кривой, рассчитанная до момента времени t, представляет собой вероятность того, что время жизни, например в открытом состоянии, равно или меньше t. Существует ряд способов, позволяющих найти вид этого распределения, но на этих вопросах мы останавливаться не будем, отправляя читателя к специфической литературе.

Для наиболее простого механизма, определенного уравнением (7.6), времена жизни в открытом состоянии распределены экспоненциально со средним временем, равным $1/\alpha$, а для времен нахождения в закрытом состоянии

$$f(t) = \beta' e^{-\beta' t},$$

т.е. эти времена распределены экспоненциально со средним значением $1/\beta'$ для одиночного канала.

Тот факт, что временной ход среднего тока через большое число ионных каналов и распределение времени жизни элементарных событий подчиняются экспоненциальному закону, не является случайным. Наиболее простая ситуация, которая обычно рассматривается для пояснения, представляет собой пример с ионотропным каналом и медиатором в виде ацетилхолина. Пусть в момент времени 0 под действием кванта медиатора ацетилхолина синхронно откроется какое-то число ионных каналов. После этого ацетилхолин исчезнет, в связи с чем канал, закрывшись, не имеет никакой возможности открыться вновь. Длительность интервалов времени, в течение которых каждый канал остается открытым, подчиняется экспоненциальному распределению (рис. 7.39, *а*), а следовательно, интегральный ток через большое число таких каналов тоже будет спадать по экспоненте (рис. 7.39, *б*).

Важным вопросом является построение гистограмм и функций плотности вероятности. При анализе активности одиночных каналов нам, как правило, приходится иметь дело с непрерывными переменными (время нахождения в открытом состоянии и т.д.), а не с дискретными или целочисленными. Распределение вероятности непрерывной переменной можно задать функцией плотности вероятности. Эта функция определяется так, что площадь под ее графиком представляет собой вероятность (или частоту). Чаще всего функция плотности вероятности является экспонентой или суммой экспонент. Например, если временной интервал имеет простое экспоненциальное распределение со средним $\tau = 1/\lambda$, то его функция плотности вероятности выглядит как

$$f(t) = \lambda e^{-\lambda t}, \ t > 0$$

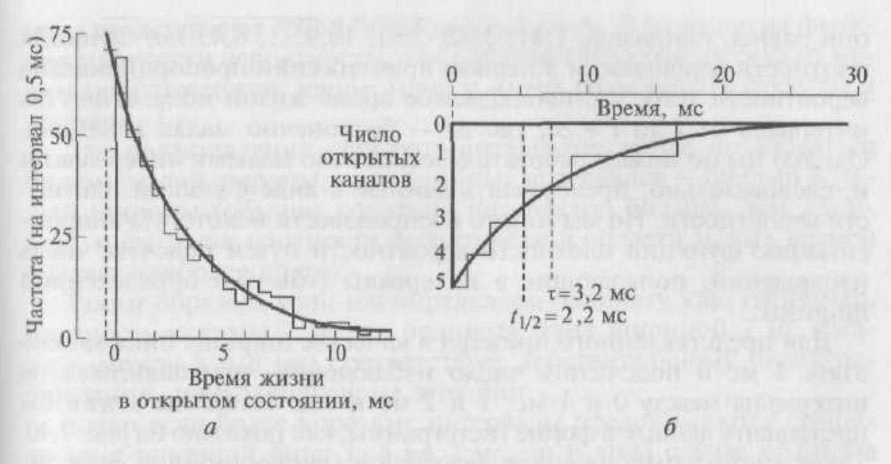


Рис. 7.39. Графики распределения времен жизни каналов:

а — экспоненциальное распределение времен жизни канала в открытом состоянии. Гистограмма показывает число открытий канала, имеющих соответствующую длительность. Разбиение по времени проводилось с шагом 0,5 мс; экспоненциальная функция плотности вероятности, которая хорошо совпадает с экспериментальными данными. Подгонка проводилась методом максимального правдоподобия. Постоянная времени экспоненты τ равна 3,2 мс, что соответствует константе скорости $\lambda = 1/\tau = 312{,}5\ \text{с}^{-1}$. В аналитической форме функция плотности вероятности имеет вид $f(t) = \lambda e^{-\lambda t} = 312{,}5e^{-312{,}5t}\ \text{с}^{-1}$; площадь под этой кривой, как и в случае любой функции плотности вероятности, равна единице. Для того чтобы совместить $f(t)$ с экспериментальным распределением, ее умножили на общее число наблюдений (480) и представили в единицах $(0{,}5\ \text{мс})^{-1}$, а не в секундах в степени –1. Штриховыми линиями представлены частоты в каждом бине, рассчитанные по аппроксимирующей кривой; *б* — общее число открытых каналов падает во времени экспоненциально с постоянной времени 3,2 мс

и имеет размерность секунды в степени –1. Площадь под кривой равна единице. Площадь, ограничиваемая каким-то произвольным временным интервалом, называется кумулятивной формой этого распределения:

$$F(t) = \text{вероятность (временной интервал} \le t) = \int_0^t f(t)\,dt = 1 - e^{-\lambda t},$$

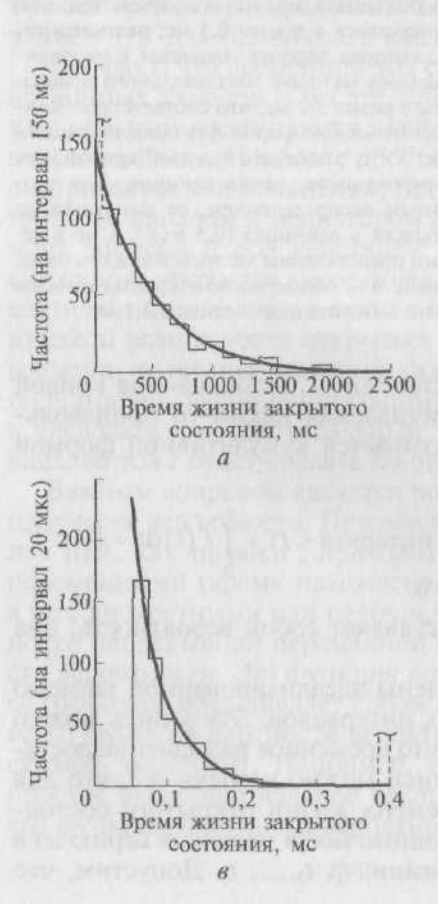
$$t > 0.$$

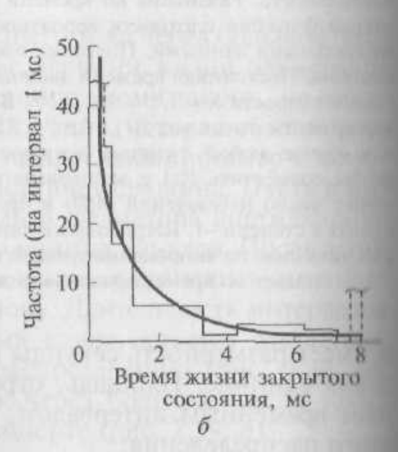
Поскольку эта величина представляет собой вероятность, она безразмерна.

На практике данные представлены идеализированной записью времен переходов или временных интервалов. Эту запись можно просматривать, чтобы убедиться, что временное разрешение достаточно. Из идеализированной записи можно извлечь все, что для нас представляет интерес, — времена жизни открытого состояния, закрытого состояния и др. Данные могут включать серию из n времен жизни в открытом состоянии: $t_1, t_2, \ldots, t_n$. Допустим, что

они равны, например, 1,41; 5,82; 3,91; 10,9;...; 6,43 мс. Функция плотности вероятности в первом приближении пропорциональна вероятности того, что наблюдаемое время жизни попадет внутрь интервала от t до $t + \Delta t$, где Δt — бесконечно малая величина. Однако мы не можем работать с бесконечно малыми интервалами и, следовательно, представлять данные в виде функций плотности вероятности. Но мы можем воспроизвести некоторую аппроксимацию функций плотности вероятности путем подсчета числа наблюдений, попадающих в интервалы («бины») определенной ширины.

Для представленного примера в качестве ширины бина можно взять 1 мс и подсчитать число наблюдений, приходящихся на интервалы между 0 и 1 мс, 1 и 2 мс и т.д. Затем мы могли бы представить данные в форме гистограммы, как показано на рис. 7.40. Такая гистограмма является разрывной (дискретной), и ее орди-





наты представляют собой безразмерные числа. В то же время функция плотности вероятности, для которой гистограмма служит неким приближением, непрерывна и имеет размерность секунды в степени –1.

Для представления коротких интервалов лучше пользоваться бинами малой ширины, а для длинных интервалов — бинами большей ширины (обычно коротких интервалов больше, чем длинных, и функция плотности вероятности в области малых времен спадает наиболее круто).

Таким образом, если мы определяем ординату как, например, плотность частоты/2 мс, то ордината бина шириной 2 мс (скажем, между 6 и 8 мс) соответствует действительному числу наблюдений, приходящихся на этот бин.

Однако если более короткие интервалы представляются графически с шириной бина 1, а не 2 мс, то в этом случае ордината (высота бина) равна удвоенному числу действительных наблюдений, попадающих в бин от 1 до 2 мс (так что площадь все равно соответствует общему числу наблюдений).

Интерпретация гистограммы распределения времен жизни в открытом состоянии обычно довольно сложная. Классически предполагается, что минимальное время жизни — очень короткое (неразрешимое технически). Тогда экспонента — наиболее вероятная аппроксимирующая функция, и ее постоянная спада (τ) дает сред-

---

Рис. 7.40. Численный пример подгонки. Функция плотности вероятности, описываемая суммой трех экспонент, методом максимального правдоподобия подгонялась к гистограмме наблюдений. Гистограмма наблюдений для ясности представлена в трех разных временных масштабах. Во всех трех случаях на гистограмму накладывалась одна и та же кривая, полученная в результате подгонки:

а — шкала времени до 2 500 мс. Показаны вклад самых длительных промежутков и, соответственно, преобладающий в этом случае вклад в функцию плотности вероятности компоненты с самой большой постоянной времени τ, равной 440 мс. Бин, обозначенный слева пунктирной линией, соответствует 548 событиям продолжительностью менее 50 мс; в силу этого их трудно наглядно представить на этой временной шкале; *б* — шкала времени до 8 мс. Показан вклад промежуточной компоненты с τ, равной 1,28 мс. Бин, обозначенный пунктиром слева, соответствует 483 промежуткам короче 1,25 мс; бин справа соответствует 429 промежуткам, длительность которых превышает 8 мс. Вклад указанных промежутков нельзя воспроизвести на дисплее в выбранном масштабе. Вклад самой быстрой компоненты на временах выше 1,25 мс фактически равен нулю. В то же время вклад медленной компоненты также незначителен: он обозначен практически горизонтальной линией с амплитудой 1,0 (на 1 мс). Следовательно, необходимость в учете промежуточной компоненты очевидна; *в* — шкала времени до 0,4 мс. Здесь преобладает самая быстрая компонента с τ_1, равной 45,2 мкс. Бин, обозначенный пунктиром справа, соответствует 457 промежуткам, длительность которых превышает 0,4 мс (не показаны)

нее время жизни в открытом состоянии. В некоторых случаях распределение бывает явно не экспоненциальное, т.е. не максимальное возле нуля.

Поэтому обычно необходимо смотреть, какую функцию взяли авторы и почему. Типичная ошибка, например, — пачечное открытие канала, когда мы наблюдаем длинное событие только потому, что техника не может зарегистрировать очень короткие переходы в закрытое состояние.

В зарубежной литературе по одной из осей графика можно встретить «No events», т.е. число событий. Иногда используют также «No of bin events», т.е. число событий в столбце. В научной литературе часто оговаривают (обычно с точки зрения сигнал/шум) и указывают ширину столбца (bin), поскольку от этого сильно зависит распределение.

Амплитуды токов через одиночный канал в большинстве случаев хорошо согласуются друг с другом. Например, распределение амплитуд на рис. 7.41, аппроксимированное (условно) гауссовой кривой, дает среднее значение 2,61 пА со стандартным отклонением 0,08 пА (т.е. 3,1 % среднего значения). Изменчивость в амплитуде от одного включения к другому для одного и того же

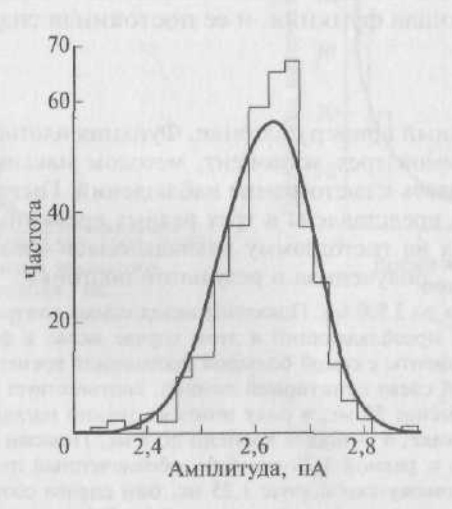


Рис. 7.41. Пример распределения амплитуд токов через одиночный канал (концевая пластинка лягушки *R. temporaria*); E_m равно −91 мВ. Средняя амплитуда для 395 отдельных событий составила 2,61 пА. Непрерывная кривая — гауссово распределение, подогнанное к экспериментальной гистограмме методом максимального правдоподобия; среднее распределение составляет 2,61 пА, стандартное отклонение равно 0,08 пА. Отметим, однако, что экспериментальная гистограмма имеет гораздо более острый пик, чем кривая Гаусса

канала или для разных каналов в мембранном фрагменте, по-видимому, очень мала. Она, вероятно, не больше ошибки в подгонке амплитуды. Следовательно, в практическом смысле амплитуда по существу не является случайной переменной, как время пребывания в открытом состоянии, и представляет собой более или менее фиксированную величину.

В некоторых экспериментах на фрагментах мембраны наблюдаются различия в амплитуде токов. Это может быть обусловлено работой двух разных, независимых типов каналов, например синаптических и внесинаптических ионных каналов, активируемых ацетилхолином. Однако это может быть следствием множественности подсостояний проводимости каналов одного и того же типа, которую наблюдали О.П.Хэмилл и Б.Сакман (O.P.Hamill, B.Sakmann, 1981). Данные такого рода приходится аппроксимировать суммой одного или более распределений Гаусса (или суммой дру-

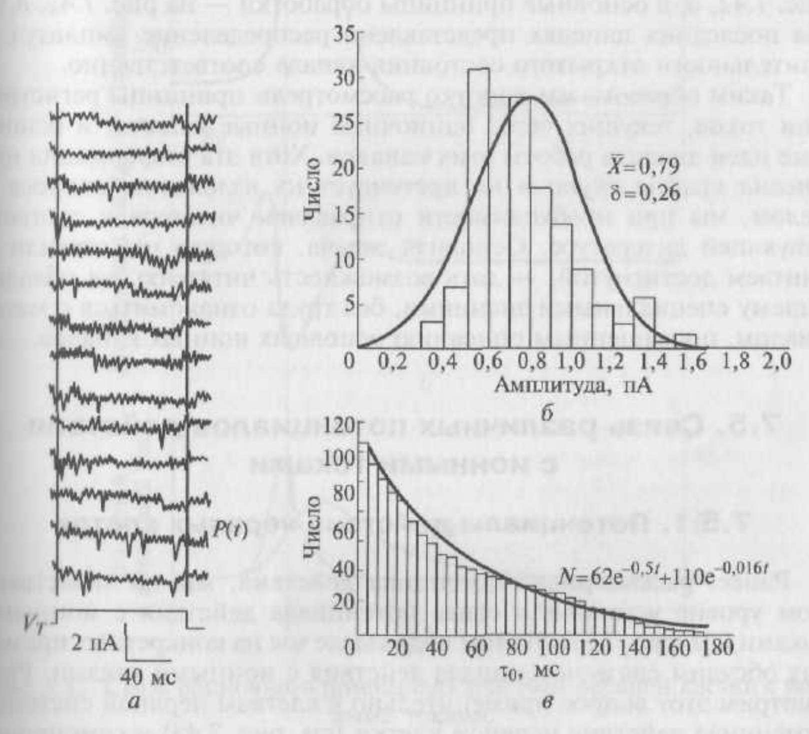


Рис. 7.42. Na^+-канал нейробластомы и его основной анализ:

а — регистрация Na^+-тока через одиночный Na^+-канал. Конфигурация outside-out patch. Поддерживаемый потенциал −90 мВ. Показано 14 зарегистрированных фрагментов канального тока; *б* — распределение амплитуд; *в* — распределение длительности открытого состояния канала

гих распределений), используя метод максимального правдоподобия. Эта процедура совершенно аналогична процедуре, применяемой для аппроксимации суммой экспоненциальных распределений.

Распределение амплитуд может служить индикатором множественности популяций каналов или подуровней проводимости. Если отдельные пики в амплитудном распределении достаточно хорошо различимы, то можно разграничить переходы на идеализированной записи в соответствии с разными амплитудами и затем анализировать серии событий с разной амплитудой раздельно.

Обычно предполагается, что амплитудная гистограмма хорошо описывается кривой Гаусса, если под пипеткой один канал и у него есть только одно открытое состояние — как на картинке. Гауссовский фит дает среднюю амплитуду тока (событий) и погрешность аппроксимации (стандартное отклонение), т.е. лучше всегда писать, например, (1,5 ± 0,5) пА.

Пример регистрации одиночного канала представлен на рис. 7.42, *а*, а основные принципы обработки — на рис. 7.42, *б*, *в*. На последних панелях представлено распределение амплитуд и длительности открытого состояния канала соответственно.

Таким образом, мы коротко рассмотрели принципы регистрации токов, текущих через одиночные ионные каналы, и основные идеи анализа работы этих каналов. Хотя эта информация написана крайне скупо и не претендует на изложение вопроса в целом, мы при необходимости отправляем читателя к соответствующей литературе. Основная задача, которую мы ставили и считаем достигнутой, — дать возможность читателю, не обладающему специальными знаниями, без труда ознакомиться с материалом, посвященным описанию основных ионных каналов.

7.5. Связь различных потенциалов действия с ионными токами

7.5.1. Потенциалы действия нервных клеток

Ранее, рассматривая потенциал действия, мы на качественном уровне установили связь потенциала действия с ионными токами (см. рис. 7.31). В этом подразделе мы на конкретных примерах обсудим связь потенциала действия с ионными токами. Рассмотрим этот вопрос применительно к клеткам нервной системы: потенциал действия нервной клетки (см. рис. 7.43) и самопроизвольное смещение мембранного потенциала до уровня критического потенциала у пейсмейкерной нервной клетки (см. рис. 7.44). Связь потенциала действия нервной клетки с ионными токами в той или иной степени представлена при обсуждении ряда вопро-

сов в предыдущих главах, поэтому ограничимся основными положениями.

Для изучения электрической активности нервных клеток используется как микроэлектродная техника, так и техника patch-clamp. Связь потенциала действия нервной клетки с ионными токами представлена в синхронной записи на рис. 7.43. На рис. 7.43, *а* показан потенциал действия нервной клетки, имеющий соответственно фронт нарастания и фронт падения (фазу реполяриза-

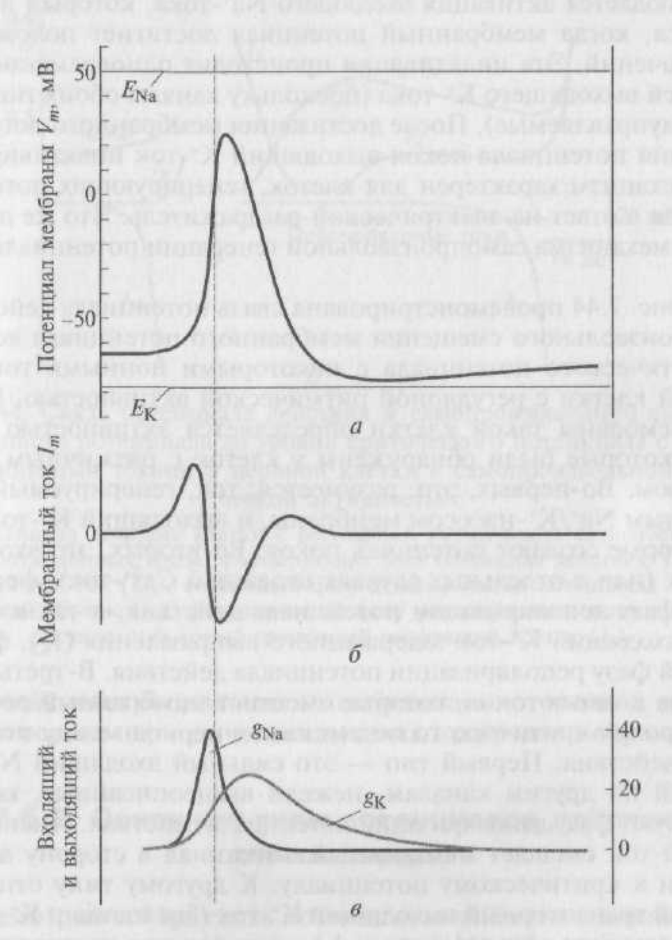


Рис. 7.43. Связь одиночного потенциала действия нервной клетки с ионными токами:

а — потенциал действия: прямыми линиями помечены равновесный натриевый и калиевый потенциалы; *б* — суммарный мембранный ток, который ведет к генерации потенциала действия; *в* — два компонента ионных токов: входящий Na^+-ток, осуществляемый через потенциалуправляемые Na^+-каналы, и выходящий K^+-ток, осуществляемый через потенциалуправляемые K^+-каналы

ции). На рис. 7.43, *б* продемонстрирован суммарный ионный ток, который приводит к возникновению потенциала действия у нервной клетки. На рис. 7.43, *в* показана синхронная запись разделенных компонент ионных токов: входящий Na^+-ток, протекающий через потенциалуправляемые Na^+-каналы, и выходящий K^+-ток, осуществляемый через потенциалуправляемые K^+-каналы. Форма потенциала действия определяется временными характеристиками мембранных токов. На уровне критического потенциала наблюдается активация входящего Na^+-тока, который инактивируется, когда мембранный потенциал достигнет положительных значений. Эта инактивация происходит одновременно с активацией выходящего K^+-тока (поскольку каналы обоих типов потенциалуправляемые). После достижения мембранного потенциала уровня потенциала покоя выходящий K^+-ток инактивируется. Этот механизм характерен для клеток, генерирующих потенциал действия в ответ на электрический раздражитель. Что же лежит в основе механизма самопроизвольной генерации потенциалов действия?

На рис. 7.44 продемонстрирована связь потенциала действия и самопроизвольного смещения мембранного потенциала до уровня критического потенциала с некоторыми ионными токами у нервной клетки с регулярной ритмической активностью. Потенциал мембраны такой клетки определяется активностью шести токов, которые были обнаружены у клеток с ритмичным электрогенезом. Во-первых, это, разумеется, ток, генерируемый электрогенным Na^+/K^+-насосом мембраны, и выходящий K^+-ток утечки, которые создают потенциал покоя. Во-вторых, это входящий Na^+-ток (или в отдельных случаях входящий Ca^{2+}-ток), формирующий фазу деполяризации потенциала действия, и так называемый выходящий K^+-ток задержанного выпрямления (I_K), формирующий фазу реполяризации потенциала действия. В-третьих, это два типа ионных токов, которые смещают мембранный потенциал до уровня критического потенциала в период между потенциалами действия. Первый тип — это сильный входящий Na^+-ток, текущий по другим каналам, нежели вышеописанные, которые формируют фазу деполяризации потенциала действия. Именно этот ионный ток смещает мембранный потенциал в сторону деполяризации к критическому потенциалу. К другому типу относится быстрый транзиторный выходящий K^+-ток (fast transient K^+-current I_t, или transient outward current I_{to}), инактивация которого устраняется следовой гиперполяризацией. Он активируется в промежутке между двумя потенциалами действия в подпороговой области мембранного потенциала. Этот ток менее чувствителен к тетраэтиламмонию и в большей степени блокируется 4-аминопиридином, чем I_K. Кроме этих шести описанных ионных токов, есть еще два — медленные Na^+-ток и K^+-ток. Они приводят к самопод-

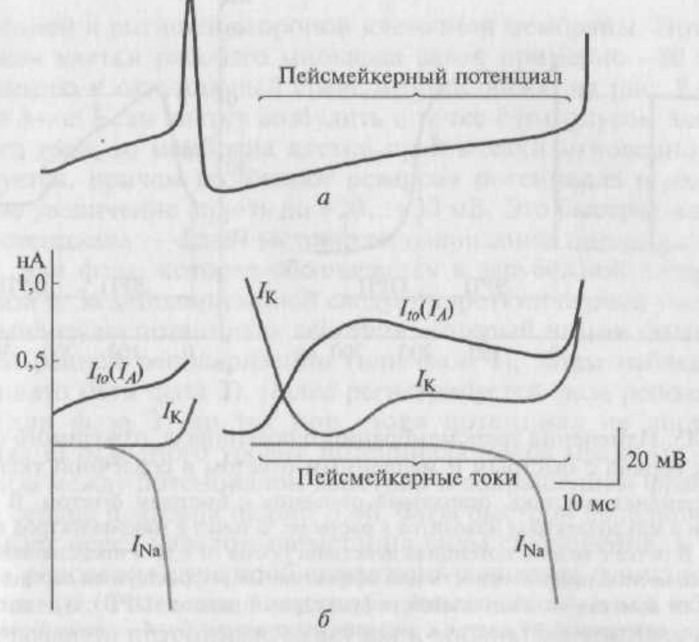


Рис. 7.44. Связь потенциала действия и самопроизвольного смещения мембранного потенциала до уровня критического потенциала с некоторыми ионными токами у нервной клетки с самопроизвольной ритмической активностью:

а — потенциал действия клетки с регулярной ритмической активностью; *б* — компоненты ионных токов, формирующих этот потенциал действия. Показаны входящий Na^+-ток (I_{Na}), создающий фазу деполяризации потенциала действия, выходящий K^+-ток (I_K), формирующий фазу реполяризации потенциала действия, и быстрый временный выходящий K^+-ток (I_{to})

держивающимся осцилляциям мембранного потенциала, которые лежат в основе периодических пачечных разрядов нейронов.

7.5.2. Основные типы потенциалов действия клеток сердца

Рассмотрим теперь связь потенциалов действия с ионными токами у клеток сердца. Потенциалы действия рабочего кардиомиоцита (см. рис. 7.45) и клетки синоатриального узла сердца, обладающей автоматией, а также механизм самопроизвольного смещения мембранного потенциала до уровня критического потенциала у этой клетки (см. рис. 7.46). Этот вопрос мы обсудим более детально, поскольку у разных популяций клеток сердца совершенно разные механизмы генерации потенциалов действия.

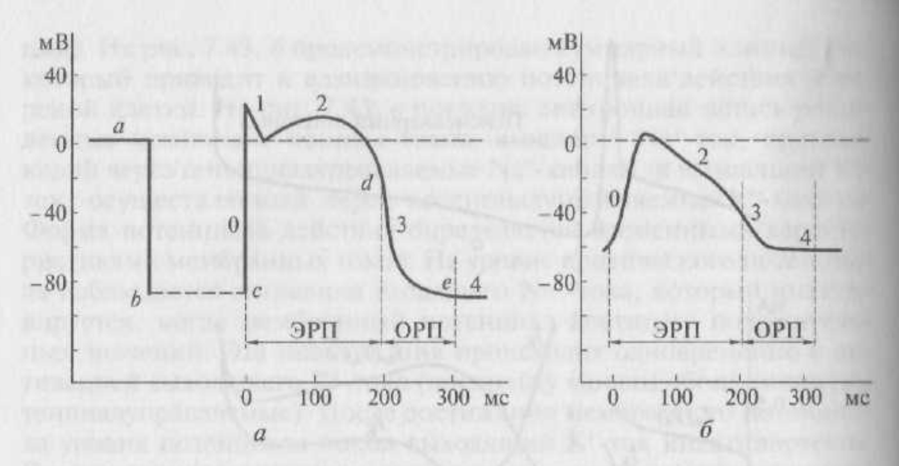


Рис. 7.45. Изменения трансмембранного потенциала, отводимого от клеток сердца с быстрым и медленным ответом в сердечной ткани:

а — потенциал действия, отводимый от клеток с быстрым ответом. В период времени *a* микроэлектрод находится в растворе. В точке *b* микроэлектрод вошел в клетку. В точке *c* возник потенциал действия. Время от *c* до *d* представляет собой фазу абсолютной рефрактерности или эффективный рефрактерный период (ЭРП), а время от *d* до *e* — относительный рефрактерный период (ОРП); *б* — потенциал действия, отводимый от клеток с медленным ответом; 0—4 — фазы потенциала действия; фазы обозначены согласно западной номенклатуре для ознакомления отечественного читателя

В сердце можно выделить два основных типа потенциалов действия, которые показаны на рис. 7.45. Первый тип — так называемый *быстрый ответ* — возникает в рабочих кардиомиоцитах предсердий и желудочков и в специализированных проводящих клетках сердца, названных клетками Пуркинье. Второй тип потенциала действия — так называемый *медленный ответ* — наблюдается у клеток синоатриального узла, атриовентрикулярного узла и специализированных клетках проводящей системы.

Для изучения электрической активности клеток сердца используется как микроэлектродная техника, так и метод patch-clamp. Микроэлектродная техника обычно используется для изучения клеток в ткани сердца, тогда как метод patch-clamp применяют для исследований одиночных изолированных кардиомиоцитов.

Рассмотрим быстрый ответ. Изменение потенциала, регистрируемого у типичного кардиомиоцита желудочка сердца, показаны на рис. 7.45, *а*. Когда микроэлектрод помещен в раствор перфузионной камеры, где находится фрагмент ткани сердца, то между ним и индифферентным электродом, как это было описано ранее, отсутствует разность потенциалов (линия *а*). В момент *b* микроэлектрод вводят внутрь клетки сердца, и измерительный прибор мгновенно регистрирует разность потенциалов (V_m) между

внутренней и внешней стороной клеточной мембраны. Потенциал покоя клетки рабочего миокарда равен примерно –80 мВ по отношению к окружающей среде и представлен на рис. 7.45 как линии *b—c*. Если клетку возбудить в точке *c* импульсом электрического тока, то мембрана клетки практически мгновенно деполяризуется, причем возникают реверсия потенциала и дальнейшее его увеличение вплоть до +20...+30 мВ. Это быстрое нарастание потенциала — *фаза быстрой деполяризации потенциала действия*, или фаза, которая обозначается в зарубежной литературе как фаза 0. За деполяризацией следует короткий период уменьшения амплитуды потенциала действия, который назван фазой частичной ранней реполяризации (или фаза 1), затем наблюдается фаза плато (или фаза 2). Далее регистрируется фаза реполяризации (или фаза 3) до тех пор, пока потенциал не достигнет (в точке *e*) исходного уровня потенциала покоя (фаза 4).

Связь между потенциалом действия и сокращением фрагмента ткани сердца показана на рис. 7.46. Фаза быстрой деполяризации возникает перед началом нарастания силы сокращения, а завершение реполяризации приблизительно совпадает с пиком силы сокращения. Релаксация мышцы происходит главным образом после возврата потенциала действия к уровню потенциала покоя. Продолжительность сокращения коррелирует с продолжительностью потенциала действия.

Медленный ответ принципиально отличается от быстрого ответа. Как следует из рис. 7.45, потенциал покоя мембраны быстрого ответа значительно более отрицателен, чем потенциал покоя медленного ответа. Кроме того, крутизна фазы деполяризации потенциала действия, амплитуда потенциала действия и величи-

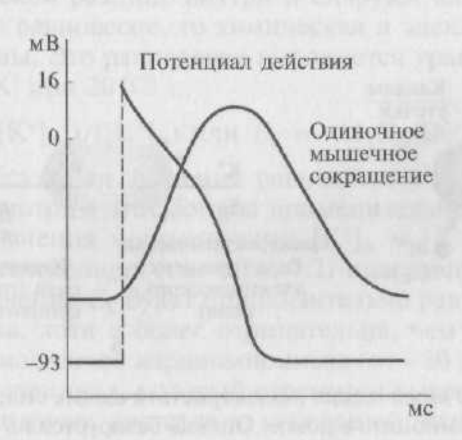


Рис. 7.46. Синхронная регистрация потенциала действия рабочего кардиомиоцита и силы, развиваемой полоской миокарда желудочка во время сокращения

на овершута быстрого ответа больше, чем медленного ответа. Два фактора — амплитуда потенциала действия и крутизна его нарастания — определяют скорость распространения потенциала действия. В ткани сердца, характеризующейся медленными ответами клеток, потенциал действия распространяется более медленно, чем в ткани сердца с быстрым ответом клеток.

Рассмотрим в деталях биоэлектрические процессы, возникающие в клетках сердца, по тому же плану, как ранее рассматривали аналогичные процессы для нервных клеток.

Потенциал покоя и различные фазы потенциала действия клеток сердца связаны с изменениями в проницаемости клеточной мембраны для ионов Na^+, K^+ и Ca^{2+}. Изменения в проницаемости мембраны клеток изменяют движения этих ионов через мембрану.

Как и для нервных клеток, концентрация ионов K^+ внутри кардиомиоцита гораздо выше, чем его концентрация вне клетки (рис. 7,47, *а*). Противоположный концентрационный градиент существует для ионов Na^+ и Ca^{2+}. Значения внеклеточной и внутриклеточной концентрации Na^+, K^+, Ca^{2+} и равновесных потенциалов для этих ионов представлены в табл. 7.2.

В покое поток ионов K^+ идет через специфические K^+-каналы. В мембранах клеток сердца есть несколько типов K^+-каналов, о чем речь пойдет ниже. Один из специфических K^+-каналов, через который ионы K^+ в покоящейся клетке выходят во внешнюю среду, является потенциалуправляемым каналом и называется K^+-каналом аномального выпрямления с током входящего направления. Ток через этот тип ионных каналов обозначается как I_{K1} и будет подробно обсуждаться далее.

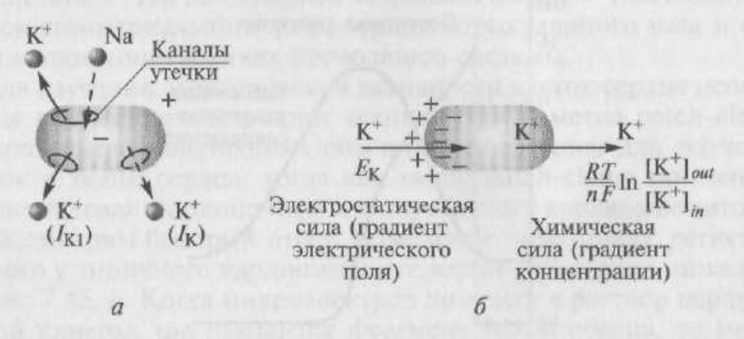


Рис. 7.47. Баланс химических и электростатических сил, действующих на мембрану кардиомиоцита в покое. Оценка базируется на отношении внутриклеточной и внеклеточной концентрации K^+ как 34 : 1 и существовании недиффундирующего аниона (A^-) внутри клетки:
а — концентрация ионов внутри и снаружи клетки; *б* — диффузия ионов K^+

Таблица 7.2. **Внутриклеточные и внеклеточные концентрации ионов и равновесные потенциалы клеток сердца**

Ион	Концентрация, ммоль/л		Равновесный потенциал, мВ
	внеклеточная	внутриклеточная*	
Na^+	145	15	+57
K^+	4	145	−94
Ca^{2+}	2	10^{-4}	+125

* Рассчитана по свободным концентрациям в цитоплазме.

В покое клеточная мембрана относительно проницаема для K^+, но, как и нервная клетка, значительно менее проницаема для ионов Na^+ (см. рис. 7.47, *а*). Таким образом, ионы K^+ стремятся диффундировать из клетки во внешнюю среду по направлению концентрационного градиента K^+, как это показано с правой стороны клетки на рис. 7.47, *б*. Но диффундируя из клетки, ионы K^+ оставляют анионы внутри клетки, и это приводит к тому, что внутренняя среда клетки становится электроотрицательной. В результате положительно заряженные ионы K^+ притягиваются внутрь клетки внутриклеточным отрицательным потенциалом, как это показано с левой стороны клетки на рис. 7.47, *б*.

Как обсуждалось ранее, в перемещении ионов K^+ *через клеточную мембрану участвуют две противоположные силы*. Химическая сила, основанная на концентрационном градиенте, приводит к общей диффузии K^+ наружу. Противоположная сила основана на электростатической разнице внутри и снаружи клетки. Если система пришла в равновесие, то химическая и электростатическая силы будут равны. Это равновесие выражается уравнением Нернста для ионов K^+ при 30 °С:

$$E_K = 61{,}5\lg([K^+]_{out})/([K^+]_{in}) \text{ или } E_K = -61{,}5\lg([K^+]_{in})/([K^+]_{out}).$$

Ранее мы обсуждали значения равновесных потенциалов для нейронов. Рассмотрим этот вопрос применительно к кардиомиоцитам. Если значения концентраций $[K^+]_{in}$ и $[K^+]_{out}$ для клеток миокарда млекопитающих (см. табл. 7.2) подставить в уравнение Нернста, то значение E_K будет приблизительно равно −90 мВ. Эта величина близка, хотя и более отрицательна, чем реально измеренный потенциал покоя кардиомиоцитов (от −80 до −85 мВ). Таким образом, потенциал, который стремится вывести K^+ из покоящейся клетки наружу, достаточно небольшой. Регистрируемый в нормальных условиях потенциал покоя отрицателен в меньшей степени (−80 мВ), чем расчетный (−90 мВ), поскольку мембрана клеток хотя и плохо, но проницаема для ионов Na^+.

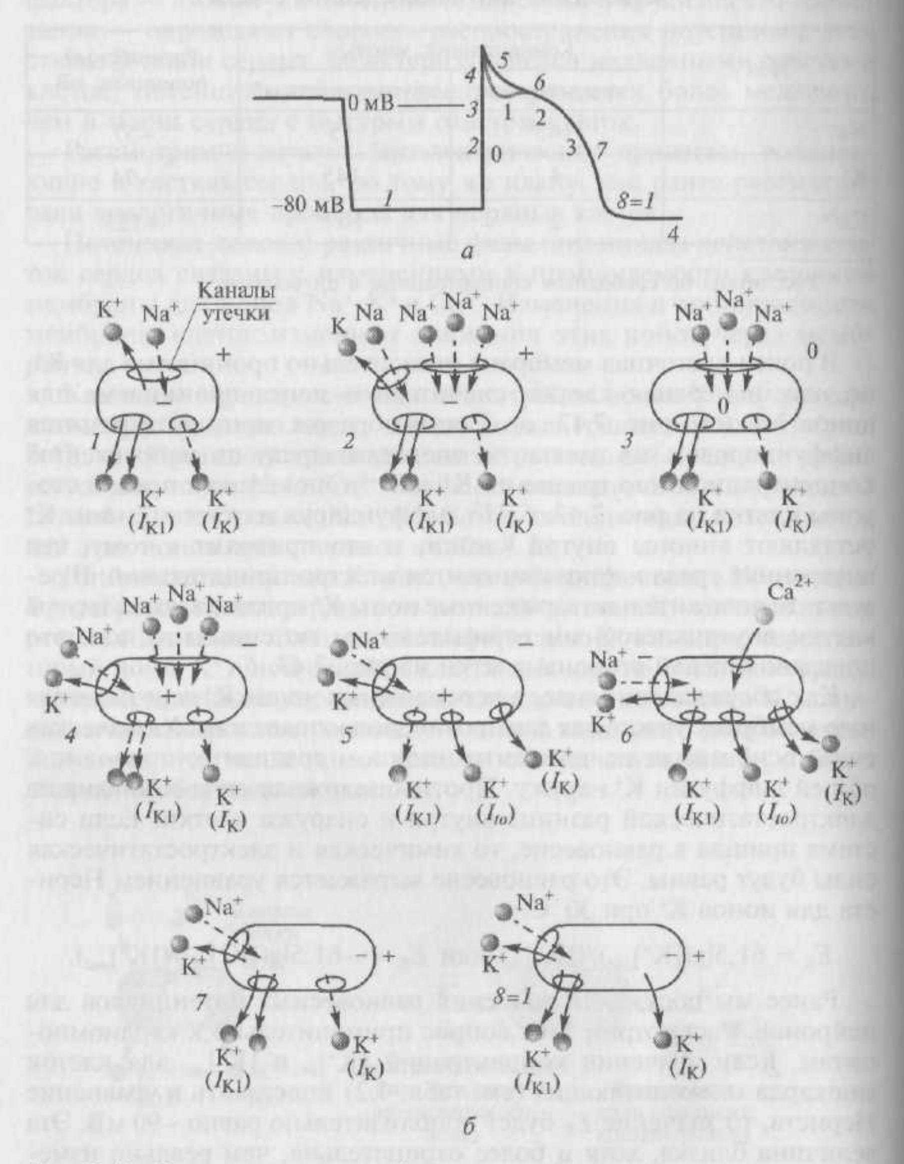


Рис. 7.48. Связь потенциала действия кардиомиоцита с ионными механизмами на качественном уровне:

а — форма потенциала действия и его основные фазы (деполяризация, ранняя реполяризация, плато и реполяризация); *б* — ионный механизм потенциала действия: *1* — потенциал покоя; *2*—*4* — стадии фазы быстрой деполяризации; *5* — фаза ранней реполяризации; *6* — фаза плато; *7* — реполяризация; *8* — восстановление исходного состояния

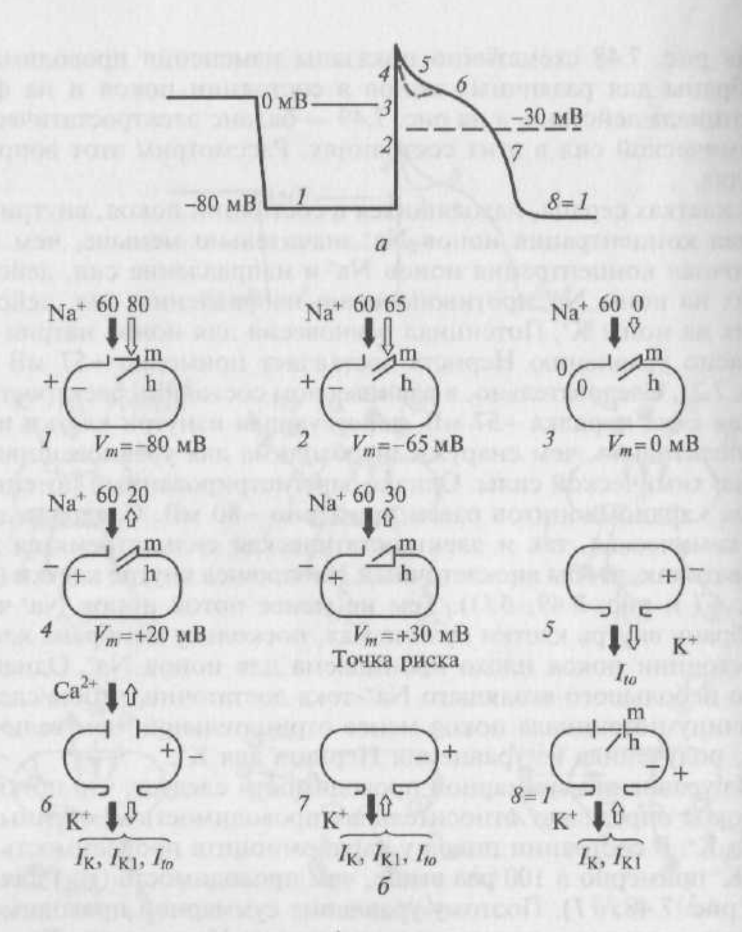
На рис. 7.48 схематично показаны изменения проводимости мембраны для различных ионов в состоянии покоя и на фоне потенциала действия, а на рис. 7.49 — баланс электростатической и химической сил в этих состояниях. Рассмотрим этот вопрос в деталях.

В клетках сердца, находящихся в состоянии покоя, внутриклеточная концентрация ионов Na^+ значительно меньше, чем внеклеточная концентрация ионов Na^+ и направление сил, действующих на ионы Na^+ противоположно направлению сил, действующих на ионы K^+. *Потенциал равновесия для ионов натрия* E_{Na}, согласно уравнению Нернста составляет примерно +57 мВ (см. табл. 7.2). Следовательно, в равновесном состоянии электростатическая сила порядка +57 мВ, действующая изнутри клетки и более позитивная, чем снаружи, необходима для уравновешивания по Na^+ химической силы. Однако зарегистрированный потенциал покоя кардиомиоцитов равен примерно −80 мВ. Следовательно, как химическая, так и электростатическая силы стремятся действовать так, чтобы внеклеточный Na^+ прошел внутрь клетки (рис. 7.48, *б1* и рис. 8.49, *б1*)). Тем не менее поток ионов Na^+ через мембрану внутрь клетки крайне мал, поскольку мембрана клетки в состоянии покоя плохо проницаема для ионов Na^+. Однако и этого небольшого входящего Na^+-тока достаточно, чтобы сделать величину потенциала покоя менее отрицательной, чем величина (E_K), полученная из уравнения Нернста для K^+.

Из уравнения суммарной проводимости следует, что потенциал покоя определяет относительная проводимость мембраны для Na^+ и K^+. В состоянии покоя у кардиомиоцита проводимость (g_K) для K^+ примерно в 100 раз выше, чем проводимость (g_{Na}) для Na^+ (см. рис. 7.48, *б1*). Поэтому уравнение суммарной проводимости обычно сводится в основном к уравнению Нернста для K^+.

Как мы уже видели, V_m покоящейся клетки составляет примерно −80 мВ. На рис. 7.48, *б1* показано движение ионов через мембрану у покоящейся клетки, а на рис. 7.49, *б1* — что в этот период m-ворота закрыты, а h-ворота открыты. Внутренняя часть клетки электроотрицательна по отношению к наружной части, так как концентрация Na^+ снаружи клетки больше, чем концентрация Na^+ внутри клетки. Поэтому как химическая, так и электростатическая силы направлены так, чтобы переносить ионы Na^+ внутрь клетки (см. рис. 7.49, *б1*), но его вход крайне мал.

Электростатическая сила с разностью потенциалов 80 мВ на рис. 7.49, *б* обозначена белой стрелкой. Химическая сила, возникающая за счет разницы в концентрации Na^+ внутри и снаружи клетки, обозначена черной стрелкой. При разнице концентраций *ионов* Na^+ *порядка 130 ммоль/1* ((145—15 *ммоль*)/1, см. табл. 7.2), разность потенциалов в 60 мВ (точно в 57 мВ) необходима для того, чтобы согласно уравнению Нернста для Na^+ сбалансировать



химическую силу, или силу диффузии. Таким образом, результирующая химическая сила, которая способствует движению Na^+ внутрь, эквивалентна разности потенциалов в 60 мВ. Поэтому в покоящейся клетке суммарная электрохимическая сила, которая способствует движению Na^+ внутрь, составит 140 мВ. Однако поскольку m ворота закрыты, проводимость клеточной мембраны в покое для Na^+ крайне низка (только по каналам утечки). Следовательно, в состоянии покоя фактически нет перемещения Na^+ в клетку.

Связь потенциала действия клеток рабочего миокарда (с быстрым ответом) с ионными токами. Если кардиомиоцит подвергнуть действию электрического раздражителя пороговой величины, то возникает его возбуждение, электрофизиологическим выражением которого является потенциал действия.

На рис. 7.48, *а* или на рис. 7.49, *а* продемонстрирован потенциал действия кардиомиоцита. Он начинается в результате смеще-

Рис. 7.49. Механизмы разных стадий потенциала действия в клетке сердца:

а — форма потенциала действия и его основные фазы; *б* — показано расположение m- и h-ворот у быстрых Na^+-каналов при различных уровнях V_m. Электростатические силы обозначены белыми стрелками, а химические (диффузионные) силы — черными. Во время потенциала покоя химическая (60 мВ) и электростатическая (80 мВ) силы благоприятствуют входу Na^+ из внеклеточного пространства, однако приток ничтожен, потому что активационные (m) ворота закрыты (стадия 1). Если V_m доведен до значений около −65 мВ, то m-ворота начинают распахиваться и Na^+ начинает входить в клетку (стадия 2). Это уменьшает отрицательный заряд внутри клетки; таким образом, еще большее количество Na^+-каналов открывается, что ускоряет втекание Na^+. Изменение в V_m также инициирует закрытие инактивационных (h) ворот, которое происходит более медленно, чем открытие m-ворот. Быстрый вход Na^+ резко уменьшает негативность V_m. По мере того как V_m приближается к нулю, электростатическая сила, притягивающая Na^+ в клетку, нейтрализуется. Тем не менее Na^+ продолжает входить в клетку из-за существенного концентрационного градиента, и V_m становится положительным (стадия 4). Когда V_m имеет позитивное значение порядка 20 мВ, Na^+ *продолжает входить в клетку, потому что диффузионные силы (60 мВ) превышают* противостоящие электростатические силы (20 мВ). Вход Na^+ тем не менее медленный, потому что общая движущая сила мала, и многие из инактивационных ворот уже закрылись (стадия 4). Когда V_m достигает значений около 30 мВ, все h-ворота закрыты и вход Na^+ прекращается; h-ворота остаются закрытыми до первой половины фазы реполяризации, и, таким образом, клетка абсолютно рефрактерна в течение всего этого периода. В течение второй половины фазы реполяризации m- и h-ворота достигают состояния, представленного в стадии *1*, и, таким образом, клетка становится относительно рефрактерной

ния потенциала покоя прямоугольным импульсом электрического тока до уровня критического потенциала, после чего в результате изменения ионных токов меняется и сам потенциал клетки, быстро нарастая в положительную область и доходя до 0 мВ. Эта фаза называется *фазой быстрой деполяризации.* Потенциал действия продолжает возрастать, пересекая уровень 0 мВ и достигая значений, лежащих около +30 мВ (точнее, разных значений для разных типов клеток). По достижении пика величина потенциала несколько падает в отрицательную область, но не достигая 0 мВ. Эта фаза называется *фазой ранней реполяризации* (она может быть плавной или иметь выемку). Далее начинается фаза плато, которая переходит в фазу реполяризации.

Как и для случая с нервной клеткой, рассмотрим связь потенциала действия с ионными токами на качественном уровне (см. рис. 7.48), силы, которые осуществляют движения ионов через мембрану (см. рис. 7.49), и связь потенциала действия с ионными

токами (см. рис. 7.50). Мы сознательно упрощаем ситуацию для лучшего понимания вопроса при дальнейшей количественной оценке. Мы искусственно разбили потенциал действия на ряд фаз, которые так или иначе связаны с изменениями ионных токов, обозначенных цифрами (см. рис. 7.48, *а* и рис. 7.49, *а*). Обсудим эти изменения, продемонстрированные под теми же цифрами на рис. 7.48, *б* и рис. 7.49, *б*. Заметьте, что обозначенные нами для лучшего понимания вопроса номера фаз потенциала действия не имеют никакого отношения к номерам фаз, принятым в зарубежной классификации.

Итак, стадия *1* (см. рис. 7.48, *б* и рис. 7.49, *б*) представляет собой потенциал покоя, механизм которого обсуждался ранее. Он принципиально сводится к незначительному входу ионов Na^+ в клетку и превышающему его выходу ионов K^+. Выход ионов K^+ определяется двумя типами K^+-токов, которые осуществляются через разные каналы. Это так называемые K^+-ток задержанного выпрямления (I_K) и K^+-ток аномального выпрямления входящего направления (I_{K1}). При этом мембрана имеет внутри отрицательный заряд, а снаружи — положительный.

Рассмотрим основные ионные токи и каналы, которые ответственны за различные фазы потенциала действия клетки сердца. Фаза 0 (включающая стадии *2*, *3* и *4*) связана со следующими процессами. Химическая и электростатическая силы способствуют входу Na^+ в клетку через быстрые Na^+-каналы, что вызывает фазу нарастания. Фаза 1 (стадия *5*) связана с тем, что химическая и электростатические силы способствуют выходу K^+ через I_{to}-каналы, что вызывает раннюю частичную реполяризацию. Фаза 2 (стадия *6*) определяется следующим. В течение плато общий вход Ca^{2+} через Ca^{2+}-каналы сбалансирован выходом K^+ через I_K-, I_{K1}- и I_{to}-каналы. Фаза 3 (стадия *7*) имеет следующую основу. Химические силы, которые способствуют выходу K^+ через I_K-, I_{K1}- и I_{to}-каналы, преобладают над электростатическими силами, которые способствуют входу K^+ через те же самые каналы. При возвращении к потенциалу покоя химические силы, которые способствуют выходу K^+ через I_K- и I_{K1}-каналы, незначительно превышают электростатические силы, которые способствуют входу K^+ через те же самые каналы.

В заключение с учетом изложенной информации рассмотрим непосредственную связь потенциала действия рабочего кардиомиоцита с ионными токами (рис. 7.50).

На рис. 7.50, *а* показана форма потенциала действия рабочего кардиомиоцита, который включает фазы быстрой деполяризации, ранней реполяризации, плато и, наконец, окончательной реполяризации. На рис. 7.50, *б* показано развитие во времени и направление суммарного ионного тока через мембрану. Входящие токи вынесены на рис. 7.50, *в*, а выходящие — на рис. 7.50, *г*.

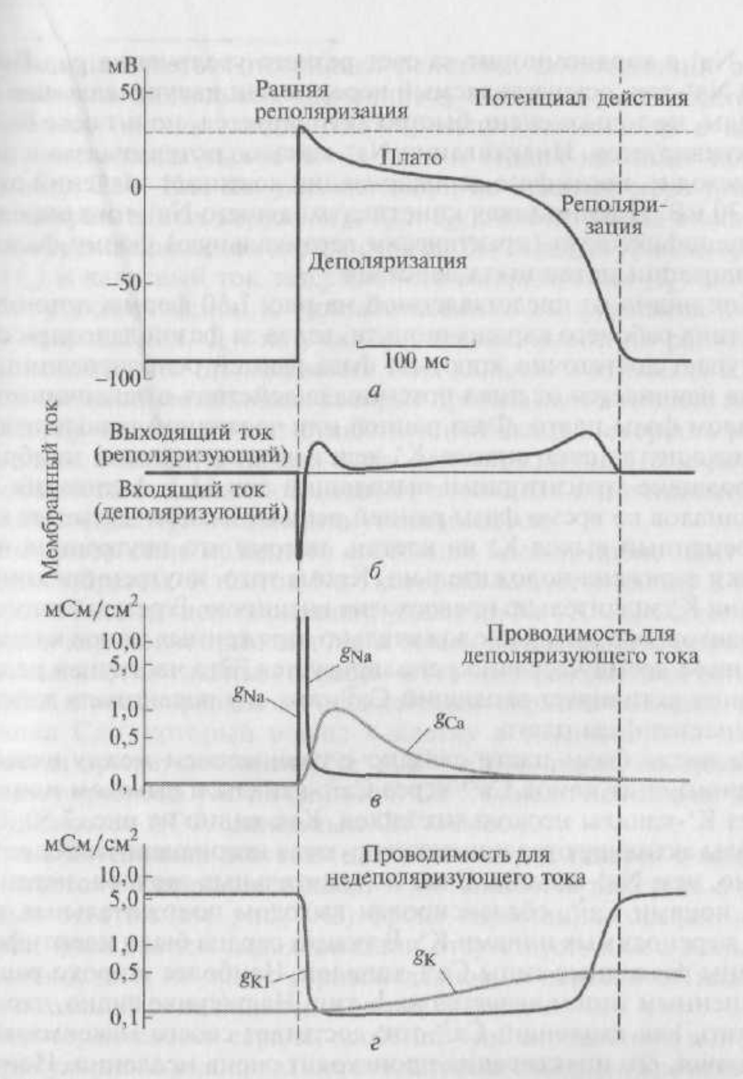


Рис. 7.50. Связь потенциала действия клетки рабочего миокарда с ионными токами:

а — форма потенциала действия рабочего кардиомиоцита; *б* — развитие во времени и направление суммарного ионного тока через мембрану, который равен выходящему току за вычетом входящего тока; *в* — изменение во времени проводимости для деполяризующих ионных токов во время потенциала действия; *г* — изменение во времени проводимости для реполяризующих ионных токов во время потенциала действия

Потенциал действия возникает и нарастает, когда стимул выше порогового быстро деполяризует мембрану, активируя быстрые Na^+-каналы. Поэтому фаза быстрой деполяризации связана с вхо-

дом Na^+ в кардиомиоцит за счет резкого увеличения g_{Na}. Входящий Na^+-ток, осуществляемый через потенциалуправляемые Na^+-каналы, не только очень быстро активируется, но и также быстро инактивируется. Инактивация Na^+-каналов потенциалзависима и происходит, когда фаза деполяризации достигает значений от +25 до +30 мВ. Именно такая кинетика входящего Na^+-тока определяет специфическую (практически вертикальную) форму фазы деполяризации потенциала действия.

Как видно из представленной на рис. 7.50 формы потенциала действия рабочего кардиомиоцита, вслед за фазой деполяризации наступает достаточно короткая фаза ранней реполяризации, которая начинается от пика потенциала действия и заканчивается с началом фазы плато. Фаза ранней или частичной реполяризации происходит за счет выхода K^+ через ионные каналы мембраны, проводящие транзиторный выходящий ток (I_{to}). Активация этих K^+-каналов во время фазы ранней реполяризации вызывает кратковременный выход K^+ из клетки, потому что внутренняя часть клетки заряжена положительно. Кроме того, внутренняя концентрация K^+ значительно превосходит внешнюю. В результате такого транзиторного выхода положительно заряженных ионов клетка на короткое время частично реполяризуется. Эта частичная реполяризация активирует входящий Ca^{2+}-ток, и у потенциала действия начинается фаза плато.

Развитие фазы плато связано с равновесием между входом в кардиомиоцит ионов Ca^{2+} через Ca^{2+}-каналы и выходом ионов K^+ через K^+-каналы нескольких видов. Как видно из рис. 7.50, Ca^{2+}-каналы активируются и инактивируются несоизмеримо более медленно, чем Na^+-каналы. Вход положительных зарядов, переносимых ионами Ca^{2+}, сбалансирован выходом положительных зарядов, переносимых ионами K^+. В тканях сердца были идентифицированы различные типы Ca^{2+}-каналов. Наиболее широко распространенным типом является их L-тип. На рисунке видно, что после того, как входящий Ca^{2+}-ток достигает своего максимального значения, его инактивация происходит очень медленно. Ионы K^+ выходят через ряд каналов, которые проводят в основном, I_{to}-, I_K- и I_{K1}-токи. Как было сказано ранее, ток I_{to} ответственен за фазу ранней реполяризации, но не инактивируется полностью до тех пор, пока не закончится фаза плато. Во время этой фазы потенциала действия трансмембранный концентрационный градиент ионов K^+ фактически такой же, как и во время фазы реполяризации, но внутриклеточный потенциал мембраны положителен, поэтому градиенты концентрации и электрического поля способствуют выходу ионов K^+ из клетки. Если бы g_K была во время плато такая же, как во время фазы реполяризации, то выход ионов K^+ во время фазы плато значительно превосходил бы вход Ca^{2+} и фаза устойчивого плато не возникала, однако как только

начинает развиваться потенциал действия, достигающий определенных положительных значений, g_K внезапно уменьшается.

Процесс окончательной реполяризации начинается в конце фазы плато, когда выход K^+ из клетки сердца начинает превышать вход Ca^{2+}. Как мы уже отмечали, по крайней мере три K^+-тока, направленных наружу (I_{to}, I_K и I_{K1}), вносят вклад в окончательную реполяризацию клеток сердца. Выходящий транзиторный ток (I_{to}) и калиевый ток задержанного выпрямления (I_K) способствуют реполяризации. K^+-ток аномального выпрямления входящего направления, I_{K1}, не участвует в возникновении реполяризации, потому что проводимость этих каналов очень мала в диапазоне значений потенциала, которые преобладают в течение плато. Однако I_{K1}-каналы вносят существенный вклад в скорость реполяризации с момента начала фазы реполяризации. По мере того как общий выход катионов смещает потенциал к потенциалу покоя, амплитуда I_{K1} постепенно увеличивается.

Восстановление исходного состояния клетки происходит следующим образом. Избыток Na^+, который входит в клетку в течение фазы быстной деполяризации, удаляется Na^+/K^+-АТФазой. Этот фермент переносит три иона Na^+ в обмен на два иона K^+, который вышел из клетки главным образом в течение фаз быстрой реполяризации и реполяризации. Аналогичным образом бóльшая часть излишка Ca^{2+}, который вошел в клетку в течение фазы плато, удаляется преимущественно Na^+ /Ca^{2+}-обменником, который обменивает три иона Na^+ на один ион Ca^{2+}, однако некоторые ионы Ca^{2+} удаляются АТФ-зависимым Ca^{2+}-насосом.

Связь потенциала действия клеток миокарда (клеток с медленным ответом) с ионными токами. У потенциалов действия с медленным ответом (см. рис. 7.45) фронт нарастания гораздо менее крутой, фаза ранней реполяризации отсутствует, плато меньшей длительности и не такое горизонтальное, а переход от плато к окончательной реполяризации менее выражен.

Некоторые клетки сердца, особенно синоатриального и атриовентрикулярного узлов, являются клетками с медленным ответом. В таких клетках деполяризация достигается главным образом за счет входа Ca^{2+} через Ca^{2+}-каналы. Реполяризация в этих волокнах сопровождается инактивацией Ca^{2+}-каналов и увеличенной K^+-проводимостью через I_{K1}- и I_K-каналы.

Медленные ответы можно вызвать искусственно. Показано, что блокирование тетродотоксином быстрых Na^+-каналов у клеток с быстрым ответом может приводить у этих клеток к формированию медленного ответа. Так, потенциалы действия клеток Пуркинье демонстрируют два типа ответов: быстрые и медленные. В контроле у типичного потенциала действия с быстрым ответом есть заметная выемка, которая отделяет фронт нарастания от плато. Потенциалы действия, полученные в условиях, когда в перфузи-

онном растворе постепенно увеличивают концентрацию тетродотоксина, чтобы вызвать блокаду разной степени быстрых Na^+-каналов, демонстрируют, что нарастание и выемка постепенно становятся менее выраженными. В результате выемка исчезает, а нарастание развивается очень постепенно, при этом потенциал действия напоминает типичный медленный ответ.

Связь потенциала действия пейсмейкерных клеток миокарда с ионными токами. По сравнению с потенциалом действия, записанным от кардиомиоцита желудочка, потенциал покоя клетки синоатриального узла обычно менее негативен, нарастание потенциала действия менее крутое, плато непродолжительно, а реполяризация более плавная. Все эти черты характерны для медленного ответа. Так же как в клетках, которые демонстрируют медленный ответ, тетродотоксин не оказывает никакого влияния на потенциал действия клеток синоатриального узла. Значит, нарастание потенциала действия не создается током, направленным внутрь через быстрые Na^+-каналы.

Трансмембранный потенциал в покоящейся клетке намного менее негативен у клеток, обладающих автоматией в синоатриальном и атриовентрикулярном узлах, чем у предсердных или желудочковых кардиомиоцитов, потому что I_{K1} (K^+-ток аномального выпрямления входящего направления) через K^+-каналы аномального выпрямления редко встречается у пейсмейкерных клеток. Поэтому отношение g_K к g_{Na} во время потенциала покоя намного меньше у пейсмейкерных клеток, чем у рабочих кардиомиоцитов. Следовательно, во время потенциала покоя V_m у пейсмейкерных клеток отклоняется намного больше от равновесного потенциала K^+ (E_K), чем у кардиомиоцитов.

Однако принципиальное свойство пейсмейкерных клеток, которое отличает его от других рассмотренных выше клеток, заключается в характере потенциала покоя. У клеток, не обладающих автоматией, потенциал покоя остается постоянным, в то время как пейсмейкерные клетки характеризуются медленной диастолической деполяризацией. Медленная диастолическая деполяризация развивается с постоянной скоростью до достижения порога, запуская потенциал действия.

Частота разряда пейсмейкерных клеток может варьировать при изменении (рис. 7.51):

1) степени деполяризации клетки;

2) максимальной негативности во время межпикового интервала;

3) порогового потенциала.

Когда скорость медленной диастолической деполяризации увеличивается (от *b* до *a* на рис. 7.51, *а*), потенциал порога достигается раньше и частота сердечных сокращений увеличивается. Повышение порогового потенциала (от ПП-1 до ПП-2 на рис. 7.51, *б*)

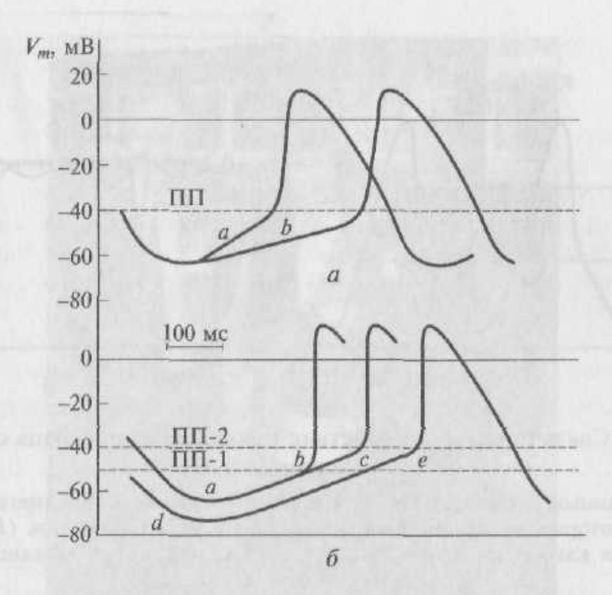


Рис. 7.51. Механизмы, вызывающие изменения частоты разряда пейсмейкера:

а — уменьшение крутизны фазы нарастания (от *a* до *b*) медленной диастолической деполяризации снижает частоту разряда; *б* — увеличение порогового потенциала (от ПП-1 до ПП-2) или увеличение потенциала покоя (от *a* до *d*) также уменьшает частоту разряда

задерживает начало фазы деполяризации (от момента времени *b* до момента времени *c*), и частота сердечных сокращений соответственно уменьшается. Точно также, когда максимальный негативный потенциал увеличен (от *a* до *d* на рис. 7.51, *б*), то требуется больше времени, чтобы достигнуть порога ПП-2, когда крутизна фазы медленной диастолической деполяризации остается неизменной, а частота сердечных сокращений, следовательно, уменьшается.

В заключение рассмотрим потенциал действия клетки узловой ткани сердца и его связь с ионными токами (рис. 7.52). Несколько ионных токов вносят вклад в медленную диастолическую деполяризацию, которая характерна для клеток сердца, обладающих автоматией. В пейсмейкерных клетках синоатриального узла, по крайней мере, три ионных тока опосредуют медленную диастолическую деполяризацию:

1) входящий ток, I_f, вызванный гиперполяризацией;
2) входящий Ca^{2+}-ток, I_{Ca};
3) выходящий K^+-ток, I_K.

Входящий ток, I_f (*funny*), активируется ближе к концу реполяризации. Этот «странный» ток переносится главным образом Na^+

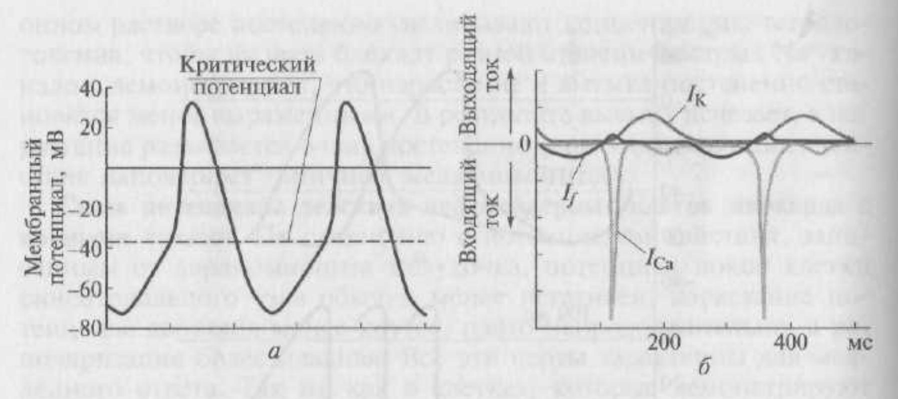


Рис. 7.52. Связь потенциала действия узловой клетки сердца с ионными токами:

а — мембранный потенциал; *б* — спонтанные изменения в синоатриальном узле, в основе которых лежат три тока: неселективный входящий ток (I_f), который переносится катионами и не блокируется ТТХ, медленный входящий Ca^{2+}-ток (I_{Ca}) и выходящий K^+-ток (I_K)

через специфические каналы, которые отличаются от быстрых Na^+-каналов. Току был пожалован титул «странного», потому что его первооткрыватели не ожидали обнаружить направленный внутрь Na^+-ток в пейсмейкерных клетках после завершения реполяризации. Этот ток активируется по мере того, как мембранный потенциал становится более негативным, чем приблизительно –50 мВ. Чем более негативен мембранный потенциал в это время, тем больше активация I_f-тока.

Второй ток, ответственный за диастолическую деполяризацию — Ca^{2+}-ток (I_{Ca}). Этот ток активируется к концу фазы медленной диастолической деполяризации по мере того, как трансмембранный потенциал достигает величины около –55 мВ (см. рис. 7.52). Как только каналы активированы, вход Ca^{2+} в клетку увеличивается. Этот приток ускоряет диастолическую деполяризацию, которая затем приводит к фазе нарастания потенциала действия.

Прогрессивной диастолической деполяризации, опосредованной двумя входящими токами, I_f и I_{Ca}, противодействует выходящий ток, K^+-ток задержанного аномального выпрямления, I_K. Эта утечка K^+ стремится реполяризовать клетку после нарастания потенциала действия; K^+ продолжает выходить наружу в течение значительного времени после максимальной реполяризации, но этот выход уменьшается на всем протяжении фазы медленной диастолической деполяризации (см. рис. 7.52). Как только ток уменьшается, его противодействие деполяризующим влияниям двух входящих токов (I_{Ca} и I_f) также постепенно уменьшается.

Рис. 7.53. Профессор Д. Нобл (D. Noble) (слева) и профессоры И. Киселева и А. Камкин в Институте физиологии Оксфордского университета (UK), 1993 г. Профессор Д. Нобл внес неоценимый вклад в развитие представлений об ионных токах в клетках сердца

Ионные основы автоматии в пейсмейкерных клетках атриовентрикулярного узла похожи на таковые в клетках синоатриального узла. Подобные механизмы также отвечают за автоматию в волокнах Пуркинье желудочков за исключением того, что в них не участвует Ca^{2+}-ток. Другими словами, медленная диастолическая деполяризация опосредована преимущественно неустойчивостью между влиянием вызванного гиперполяризацией входящего тока I_f и постепенно уменьшающимся выходящим K^+-током I_K.

Огромный вклад в исследование связи потенциала действия кардиомиоцитов с ионными токами внес британский ученый Д. Нобл (D. Noble) (рис. 7.53).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Костюк П. Г. Механизмы электрической возбудимости нервной клетки / П. Г. Костюк, О. А. Крышталь. — М. : Наука, 1981.

Магура И. С. Проблемы электрической возбудимости нейрональной мембраны / И. С. Магура. — Киев : Наукова думка, 1981.

Cole K.S. Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane // Arch. Sci. Physiol. — 1949. — V. 3. — P. 253.

Cole K.S. Membranes, ions and impulses / K.S. Cole. — Barkeley : University California Press, 1968.

Frank K. Voltage-clamp studies of moluscan neuron membrane properties / K. Frank, L. Tauc // The cellular function of membrane transport / ed. by J. F. Hoffman. — Elglewood Cliffs : Prentice-Hall, 1963. — P. 113 — 135.

Frankenhaeuser B. The action potential in the myelinated nerve fibre of Xenopus laevis as computed on the basis of voltage clamp data / B. Frankenhaeuser, A. F. Huxley // J. Physiol. — 1964. — V. 171. — P. 302 — 315.

Hamill O. P. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches / O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher et al. // Europ. J. Physiol. — 1981. — V. 391(2). — P. 85 — 100.

Hamill O. P. Multiple conductance states of single acetylcholine receptor channels in embryonic muscle cells / O. P. Hamill, B. Sakmann // Nature. — 1981. — V. 294(5840). — P. 462 — 464.

Hodgkin A. L. The Conduction of the Nervous Impulse / A. L. Hodgkin. — Liverpool University Press, 1964.

Katz B. Nerve, Muscle and Synapse / B. Katz. — McGraw-Hill Book Company, 1966.

Neher E. Properties of somatic membrane patches of snail neurons under voltage clamp / E. Neher, H.D. Lux // Europ. J. Physiol. — 1971. — V. 322(1). — P. 35 — 38.

Neher E. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres / E. Neher, B. Sakmann // Nature. — 1976. — V. 260(5554). — P. 799 — 802.

ГЛАВА 8

ПОТЕНЦИАЛУПРАВЛЯЕМЫЕ НАТРИЕВЫЕ КАНАЛЫ

8.1. Общая характеристика натриевых каналов

Как уже неоднократно отмечалось ранее, ионные каналы — основные компоненты мембраны, обеспечивающие работу живой клетки. Они представляют собой интегральные белки и позволяют специфическим ионам пройти через них, т.е. по существу пересечь мембрану, поскольку другие пути перехода ионов по электрохимическому градиенту невозможны. Плазматическая мембрана действует как барьер, отделяющий содержимое клетки от внешней среды, так что концентрация ионов в клетке поддерживается на уровнях, значительно отличающихся от уровней во внеклеточной жидкости. Эти различия в концентрациях ионов приводят к различиям электрического потенциала между цитоплазмой и внешней средой, приводя к электрохимическому градиенту поперек мембраны для каждого типа иона. Клетки используют эти электрохимические градиенты для передачи сигналов.

Важная роль во всех этих процессах принадлежит ионным каналам. К настоящему времени описано большое количество различных ионных каналов, и их количество постоянно увеличивается. Это разнообразие ионных каналов ведет к проблемам в их классификации и спецификации. Если каналы описывать в терминах их ионной селективности и их воротных свойств, то возможно выделить три главные группы ионных каналов — потенциалуправляемые, лигандуправляемые и механоуправляемые. Принадлежность каналов к первой группе определяется тем, что они активируются изменением мембранного потенциала и известны как voltage-gated, или зависимые от потенциала каналы. Na^+-каналы, которые рассматриваются в настоящей главе, принадлежат именно к этой группе. Потенциалуправляемые Na^+-каналы (далее Na^+-каналы) — это главные элементы инициации потенциала действия и его проведения в возбудимых клетках, потому что они ответственны за начальную деполяризацию мембраны. Среди многих известных потенциалуправляемых каналов Na^+-каналы сыгра-

ли большую роль в истории физиологии. С объяснения их фундаментальных свойств у аксона кальмара А.Л. Ходжкином и А.Ф. Хаксли и позднее многими другими авторами началась современная теория ионных каналов. Кроме того, Na^+-каналы — это первые потенциалуправляемые каналы, которые были клонированы. Этот подход, использующий современные методы молекулярной биологии вместе с техникой patch-clamp, ведет к лучшему пониманию их структуры и функции.

В сердечных, нервных и мышечных клетках потенциал действия инициируется активацией быстрых Na^+-каналов. Активация быстрых Na^+-каналов, которые расположены в мембране, ведет к увеличению проходимости для ионов Na^+, сопровождаемой движением ионов Na^+ внутрь клетки через эти каналы. После периода, лежащего в диапазоне между 0,5 мс и несколькими сотнями миллисекунд, проводимость для ионов Na^+ быстро уменьшается из-за инактивации каналов. Однако этот очень короткий, но все же «лавинообразный» поток ионов Na^+ создает предпосылки для развития каскада событий, заканчивающихся сокращением ткани и/или проведением электрических импульсов.

Как последствие входящего Na^+-тока, другие потенциалуправляемые ионные каналы, например K^+-каналы и Ca^{2+}-каналы, активируются и вносят свой вклад в развитие потенциала действия. Так, Ca^{2+}-каналы ответственны за фазу плато потенциала действия у кардиомиоцитов, и входящие ионы Ca^{2+} запускают выход относительно большого количества ионов Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ. Именно этот Ca^{2+} запускает процесс сокращения. Кроме активированного и инактивированного состояния, Na^+-каналы могут быть в состоянии покоя. И в состоянии покоя, и в состоянии инактивации проводимость через каналы отсутствует, но каналы, которые были *инактивированы длительной деполяризацией*, не могут быть активированы, пока клетка не становится повторно поляризованной. Реполяризация преобразует канал из инактивированного состояния в состояние покоя. Другими словами, Na^+-каналы подвергаются циклическим изменениям в форме трех функционально отличающихся состояний, начинающихся с состояния покоя, которое переходит в активированное и затем в инактивированное состояние.

В этой главе рассмотрено принятое в настоящее время объяснение функции, структуры и фармакологической модуляции Na^+-каналов. В последние несколько лет развитие молекулярных методов биологии позволило намного более точно исследовать многие из этих аспектов. Затрагиваются вопросы активации, инактивации и фармакологии Na^+-каналов. Однако читателям, которые хотят изучить этот вопрос на профессиональном уровне, необходимо обратиться к последним обзорам и оригинальным статьям на эту тему.

8.2. Молекулярная организация натриевого канала

Na^+-каналы состоят из широко разветвленной α-субъединицы, молекулярная масса которой приблизительно равна 260 кДа. Разветвленная α-субъединица связана с добавочными β-субъединицами. Na^+-каналы в клетках центральной нервной системы взрослых животных содержит β_1- (или β_3-) и β_2-субъединицы, в то время как Na^+-каналы в скелетных мышцах взрослых животных имеют только β_1-субъединицу. Хотя порообразующая α-субъединица достаточна для обеспечения функции, но кинетика и потенциалзависимость воротного механизма канала модифицируется β-субъединицами. α-Субъединица организована в четыре гомологичных домена (I—IV), каждый из которых содержит шесть трансмембранных α-спиралей (сегменты S1—S6), а добавочная петля поры локализована между сегментами S5 и S6 (рис. 8.1). Ограничивающая пору петля снаружи ограничивает узкий вход в пору, в то время как сегменты S5 и S6 ограничивают внутренний, более широкий выход из поры. Сегменты S4 в каждом домене содержат положительно заряженные аминокислотные остатки (аа) в каждой третьей позиции. Эти остатки выступают как воротные заряды и двигаются через мембрану, чтобы инициировать канальную активность в ответ на деполяризацию мембраны. Короткая внутриклеточная петля, соединяющая гомологичные домены III и IV, выступающая в роли инактивационных ворот, образует складку, внедряющуюся внутрь канальной структуры, и блокирует пору изнутри в течение длительной деполяризации мембраны.

Ранние биохимические исследования, использующие радиоактивные токсины как метки для Na^+-каналов, позволили выделить в их структуре гликопротеин, молекулярная масса которого лежала в диапазоне от 260 до 280 кДа (упомянутый как α-субъединица) из Na^+-каналов угря, мозга крысы и сердца цыпленка. Позже клонирование и секвенция других Na^+-каналов позволили предсказать топологию и расположение в пределах α-субъединицы (рис. 8.2, *а*, *б*).

Вблизи α-субъединицы некоторые Na^+-каналы содержат одну или две небольшие субъединицы, названные β_1- и β_2-субъединицами. Было показано, что Na^+-канал из клеток мозга крысы является гетеротримерным белком, содержащим α-, β_1- и β_2-субъединицы, тогда как клетки сердечной и скелетной мышц содержат только α- и β_1- субъединицы. По-видимому, у Na^+-каналов в тканях различных видов животных с α-субъединицей всегда связан тот или иной тип β-субъединиц. Исключение составляет электрический орган угря и сердце цыпленка, содержащие только α-субъединицу.

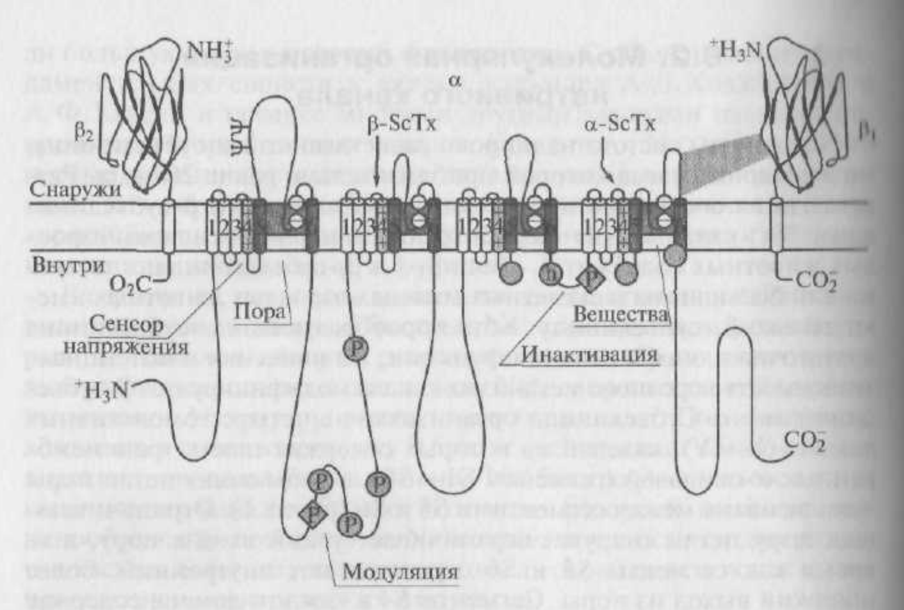


Рис. 8.1. Основные структуры субъединиц потенциалуправляемых Na^+-каналов (показаны как трансмембранные диаграммы). Цилиндры представляют вероятные α-спиральные сегменты. Жирные линии — цепи полипептида каждой субъединицы с длиной, приблизительно пропорциональной числу остатков аминокислот в субтипах Na^+-каналов мозга. Внеклеточные участки β_1- и β_2-субъединиц показаны как складки, подобные иммуноглобулину; Ψ — участки вероятного гликозилирования; Р — места фосфорилирования протеинкиназой А (круги) и протеинкиназой С (ромбы); h — инактивационная частица в петле инактивационных ворот. Показаны участки связывания α- и β- токсинов скорпиона, а также участок взаимодействия между α- и β_1-субъединицами

Благодаря быстрому развитию методов молекулярной биологии было клонировано большое количество Na^+-каналов и определена последовательность аминокислот, их формирующих. В табл. 8.1 суммированы известные данные об α-субъединице Na^+-канала. Каждая изоформа, рассматриваемая в свете структурных моделей, представляет своего рода естественно появившуюся мутацию, обеспечивая ключи к разгадке того, какая часть первичной структуры несет специфическую функцию. Для изучения функционального разнообразия большинство клонированных Na^+-каналов было экспрессировано в те или иные системы, однако экспрессия некоторых клонированных Na^+-каналов оказалась неудачной (сердце цыпленка, электрический орган угря).

Хотя структура инактивационных ворот K^+-каналов так же, как и у Na^+-каналов, была в последнее время определена методом ядерного магнитного резонанса, этот косвенный подход остается

главным инструментом для предсказания структуры больших белковых молекул, формирующих каналы. Маловероятно, что трехмерная структура целого белка в ближайшем будущем будет полностью установлена рентгенокристаллографией или ядерным магнитным резонансом (из-за размера и гидрофобной природы белка); мы, однако, можем предсказать вторичную структуру и некоторые особенности третичных структур на основе первичной аминокислотной последовательности.

α-Субъединица. α-Субъединица является основной субъединицей канала. Даже когда α-субъединица экспрессируется в системы другого вида (иного происхождения), это сохраняет все главные

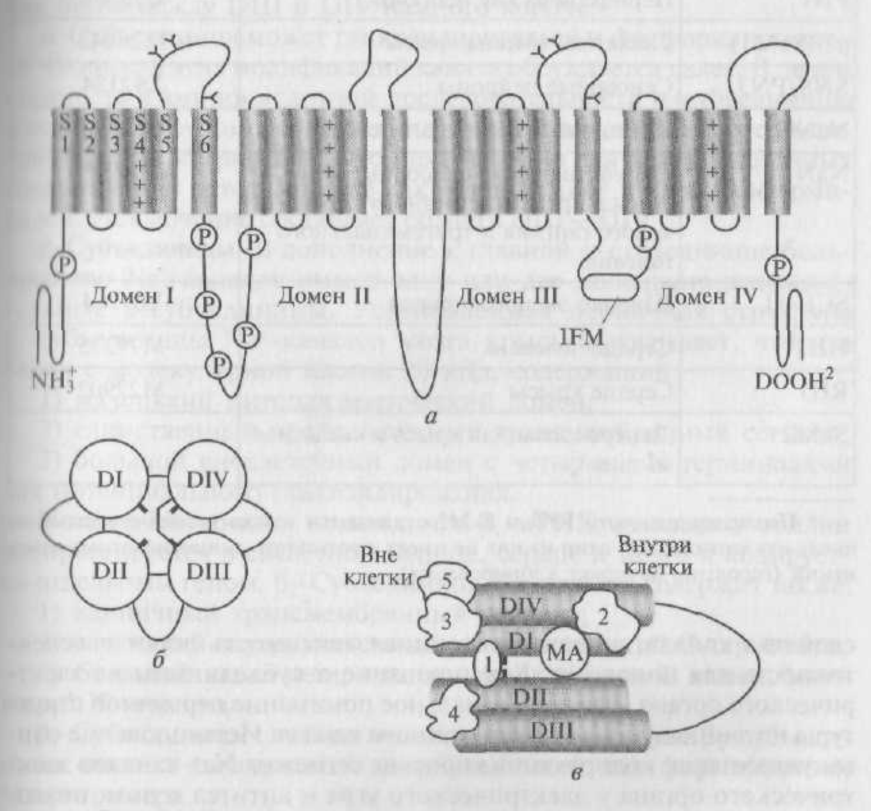


Рис. 8.2. Топология потенциалуправляемых Na^+-каналов:

а — α-субъединица потенциалуправляемого Na^+-канала, состоящая из четырех доменов (DI—DIV), каждый из которых содержит шесть трансмембранных сегментов S1—S6. Отдельные сегменты и домены связаны внутриклеточными и внеклеточными петлями. Изолейцин, фенилаланин и метионин (IFM-структура) играют принципиальную роль в инактивации потенциалуправляемого Na^+-канала; *б* — трансмембранное расположение доменов α-субъединицы вокруг канальной поры; *в* — связывающие участки (1—5) лигандов потенциалуправляемого Na^+-канала; МА — предполагаемое место связывания местных анестетиков

Таблица 8.1. **Клонированные α-субъединицы потенциалуправляемых Na^+-каналов**

α-Субъединица	Распространение в ткани	Каталожный номер генного банк/EMBL
αI	Мозг крысы	X03638
αII	То же	X03639
αIII	»	Y00766
Na6	Мозг крысы, нейроны и глия	L39018
PN1	Периферические нейроны	U79568
μ1 (SkM1)	Скелетная мышца крысы	M26643
SNS/PN3	Сенсорные нейроны	X92184
NaNG	Ганглионарные нейроны собаки	U60590
NaN	Периферические сенсорные нейроны в пределах спинного корешкового ганглия и тригеминального ганглия	AF059030
SCL-11	Широко экспрессирован	Y09164
HH1	Сердце человека	M77235
RH1	Сердце крысы	M27902
SkM2*	Денервированная крыса и скелетная мышца	—

* Последовательности RH1 и SkM2 отличаются только по незначительному числу нуклеотидов; ни один из них не имеет в результате аминокислотных изменений (вероятно, артефакт клонирования).

свойства канала, включая потенциалзависимость ворот и селективность для ионов Na^+. Клонирование α-субъединицы из электрического органа угря дало начальное понимание первичной структуры потенциалуправляемого ионного канала. Использование олигонуклеотидов, кодирующих короткие сегменты Na^+-каналов электрического органа у электрического угря и антител к ним, позволило успешно выделить цДНК, кодирующие целые полипептиды. Предположенная последовательность аминокислот показала структуру, которая обычна для всех известных Na^+-каналов (см. рис. 8.2, *а*). Это большой белок с четырьмя внутримембранными гомологичными доменами (DI — DIV), каждый из которых содержит многократный набор α-спиральных трансмембранных сегментов (S1 — S6) 19 — 27 остатков. Эти трансмембранные сегменты связаны «неконсервативными» гидрофильньными последовательностями (т.е.

последовательностями аминокислот, которые различны в разных каналах). Четвертый трансмембранный сегмент (S4) каждого домена — положительно заряженный с множеством «консервативных» (постоянно присутствующих) аргининов или лизинов, расположенных в каждом третьем положении. Это та часть канала, которая может быть сенсором напряжения. Амино- и карбокситерминали находятся на внутриклеточной стороне, что четко показано исследованием связывания антител с электрическим органом угря. Петли, соединяющие домены, локализованы в цитоплазматической области. Как показано на рис. 8.2, *а*, соединяющие петли между DI и DII, а также DII и DIII длинные, тогда как петля между DIII и DIV намного короче.

α-Субъединица может гликозилироваться и фосфорилироваться. Важность этих модификаций канала обсуждается далее. В целом сходность в аминокислотной последовательности α-субъединицы максимальна в гомологичных участках трансмембранных сегментов от S1 до S6 (рис. 8.3), что нехарактерно для внутриклеточных соединяющих петель, так же как и для амино- и карбокситерминалей. Исключение составляет область DIII—DIV.

β-Субъединицы. В дополнение к главной α-субъединице большинство Na^+-каналов имеют одну или две маленькие вспомогательные β-субъединицы. Установленная первичная структура β_1-субъединицы Na^+-каналов мозга крысы показывает, что это белок с молекулярной массой 23 кДа, содержащий:

1) маленький цитоплазматический домен;

2) единственный предполагаемый трансмембранный сегмент;

3) большой внеклеточный домен с четырьмя N-терминалями для потенциального гликозилирования.

Northen blot-анализ показал, что β_1-мРНК человека в обилии экспрессируется в скелетной мышце, сердце и мозге и кодируется отдельным геном. β_2-Субъединица Na^+-канала содержит также:

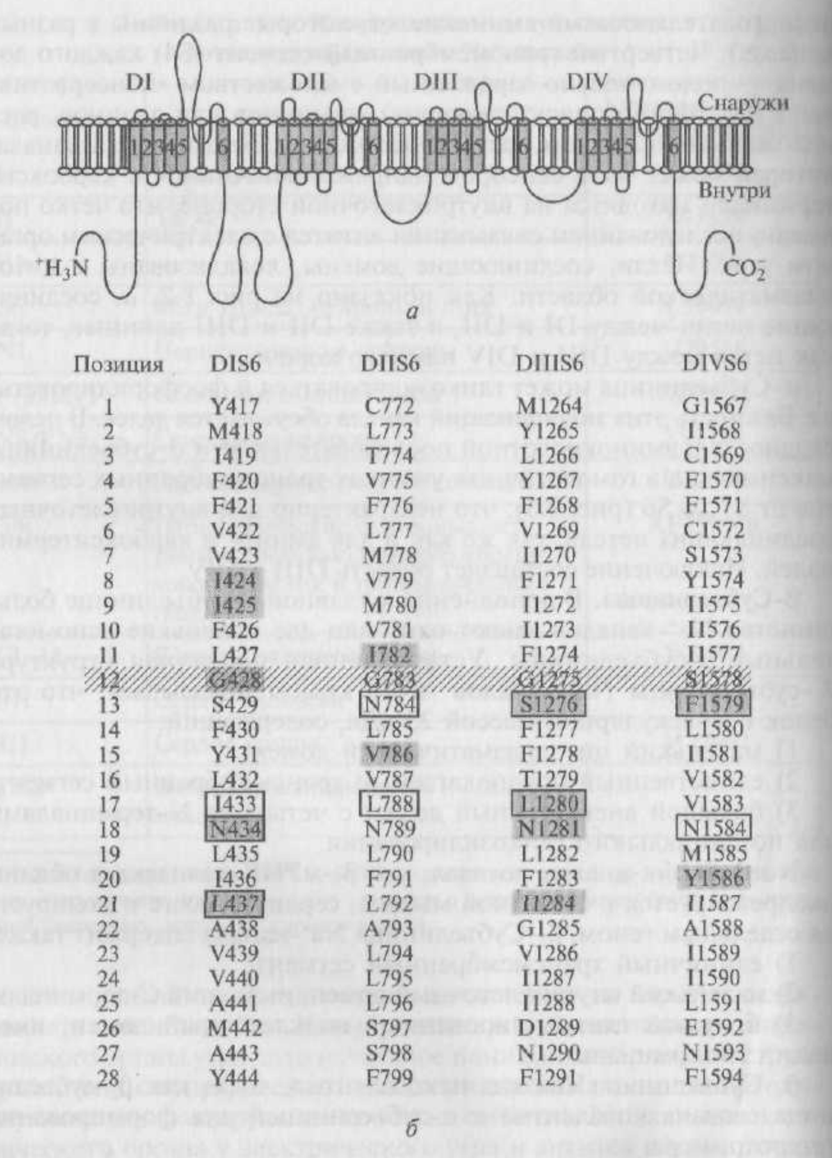
1) единичный трансмембранный сегмент;

2) маленький внутриклеточный домен, имеющий С-терминаль;

3) большой гликозилированный внеклеточный домен, имеющий N-терминаль.

β_1-Субъединица связана нековалентно, тогда как β_2-субъединица связана ковалентно с α-субъединицей для формирования гетеротримера.

Для изучения роли β_1- и β_2-субъединиц Na^+-канала использовались различные биохимические методы. Было обнаружено, что β_2-субъединица может быть удалена из очищенного Na^+-канала клеток мозга крысы без какого-либо видимого эффекта, тогда как удаление β_1-субъединицы приводило к потере всех функциональных свойств. Потеря активности может быть частично предотвращена внутримолекулярным связыванием (cross-linking) с α-субъединицей, если предположить, что взаимодействие с β_1-субъеди-



Позиция	DIS6	DIIS6	DIIIS6	DIVS6
1	Y417	C772	M1264	G1567
2	M418	L773	Y1265	I1568
3	I419	T774	L1266	C1569
4	F420	V775	Y1267	F1570
5	F421	F776	F1268	F1571
6	V422	L777	V1269	C1572
7	V423	M778	I1270	S1573
8	I424	V779	F1271	Y1574
9	I425	M780	I1272	I1575
10	F426	V781	I1273	I1576
11	L427	I782	F1274	I1577
12	G428	G783	G1275	S1578
13	S429	N784	S1276	F1579
14	F430	L785	F1277	L1580
15	Y431	V786	F1278	I1581
16	L432	V787	T1279	V1582
17	I433	L788	L1280	V1583
18	N434	N789	N1281	N1584
19	L435	L790	L1282	M1585
20	I436	F791	F1283	Y1586
21	L437	L792	I1284	I1587
22	A438	A793	G1285	A1588
23	V439	L794	V1286	I1589
24	V440	L795	I1287	I1590
25	A441	L796	I1288	L1591
26	M442	S797	D1289	E1592
27	A443	S798	N1290	N1593
28	Y444	F799	F1291	F1594

б

Рис. 8.3. Предполагаемая трансмембранная топология α-субъединицы потенциалуправляемого Na^+-канала:

а — цилиндры, представляющие шесть α-спиральных трансмембранных сегментов у доменов DI—DIV. Показаны интердоменные линкеры; *б* — аминокислотные последовательности в пределах сегментов S6 (DIS6, DIIS6, DIIIS6 и DIVS6) $Na_V1.4$-канала скелетной мышцы крысы. Аминокислотные остатки в серых рамках важны для связывания местных анестетиков. Аминокислотные остатки в белых рамках важны для связывания BTX. В позиции 12 указан предполагаемый воротный шарнир, содержащий глицин/серин, остаток заштрихован

ницей может служить, по крайней мере частично, для того чтобы стабилизировать структуру α-субъединицы.

β_1-Субъединица оказывает множественные эффекты на функции Na^+-канала: увеличивает пиковый ток, ускоряет активацию и инактивацию, изменяет зависимость инактивации от напряжения. Хотя только α-субъединицы достаточны для формирования функциональных каналов, β_1-субъединицы играют роль в модуляции кинетики инактивации. Рекомбинантная α-субъединица Na^+-канала клеток мозга и скелетной мышцы, экспрессированная в ооциты ксенопуса, проявляет аномально медленную инактивацию по сравнению с Na^+-током, присутствующим в нативной ткани. Было показано, что коэкспрессия β_1-субъединицы скелетной мышцы, клеток сердца или мозга человека с рекомбинантной α-субъединицей скелетной мышцы человека в ооциты ксенопуса приводит к быстрой инактивации Na^+-тока. Напротив, β_1-субъединица клеток этих органов не оказывает никакого эффекта на функцию α-субъединицы Na^+-канала клеток сердца человека. Интересно, что обе β-субъединицы содержат подобные иммуноглобулину повторяющиеся последовательности, подобные тем, которые найдены во многих молекулах, обеспечивающих адгезию клеток. Поскольку почти для всех иммуноглобулиноподобных повторяющихся последовательностей идентифицировано взаимодействие с внеклеточными белковыми лигандами, предложено, что β_1- и β_2-субъединицы, возможно, выполняют сходные функции и могут действовать аналогично молекулам, обеспечивающим адгезию клеток в нервной системе.

8.3. Классификация и номенклатура натриевых каналов

Различные варианты Na^+-каналов были идентифицированы электрофизиологической регистрацией, биохимической очисткой и клонированием. Na^+-каналы — это основные члены суперсемейства ионных каналов, которое включает потенциалуправляемые K^+- и Ca^{2+}-каналы, однако в отличие от различных классов K^+- и Ca^{2+}-каналов функциональные свойства известных Na^+-каналов относительно схожи. Несмотря на их сходство в функции, Na^+-каналы были изначально названы на основании многих различных принципов без постоянной номенклатуры для различных изоформ. Чтобы устранить эту странную ситуацию, включающую множество наименований, для Na^+-каналов была разработана стандартная номенклатура, построенная по тому же принципу, что и номенклатура для потенциалуправляемых K^+-каналов, которая используется в настоящее время. Чтобы устранить огромную систему определенных субсемейств и субтипов,

основывались на сходстве между аминокислотными последовательностями каналов. Сравнимая номенклатура была также адаптирована для потенциалуправляемых Ca^{2+}-каналов. В этой номенклатурной системе имя и индивидуальный канал представлены в виде химического символа, который показывает главный проходящий ион (Na^+) с главным физиологическим регулятором канала (потенциалом — voltage gate channels), и это записывается вместе как Na_V. Число после этих символов показывает генное подсемейство (в настоящее время это только Na_V1), а число, следующее за точкой, показывает специфическую канальную изоформу (например, $Na_V1.1$). Это последнее число было предложено для того, чтобы показать порядок, в котором каждый ген был идентифицирован. Перекрещивающиеся варианты каж-

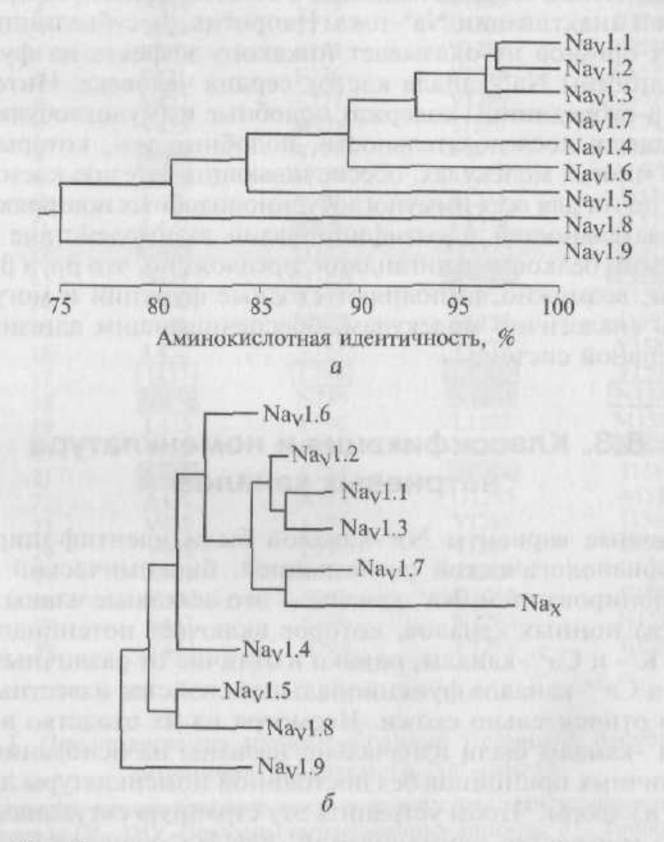


Рис. 8.4. Подобие последовательности аминокислот и филогенетические взаимоотношения α-субъединиц потенциалуправляемых Na^+-каналов:

а — сравнение аминокислотной идентичности для Na^+-каналов крысы $Na_V1.1$ — $Na_V1.9$; *б* — филогенетические взаимоотношения последовательностей Na^+-каналов крысы $Na_V1.1$ — $Na_V1.9$ и Na_X

ного члена семейства определяются как маленькие буквы, следующие за номером (например, $Na_V1.1a$).

Девять идентифицированных изоформ Na^+-каналов млекопитающих функционально более чем на 50 % идентичны по своей аминокислотной последовательности в трансмембранных и экстрацеллюлярных доменах, где аминокислотная последовательность одинакова. Этого достаточно для четкого выстраивания в ряд всех Na^+-каналов (рис. 8.4, *а*). Для K^+- и Ca^{2+}-каналов все члены определенных подсемейств менее чем на 50 % идентичны членам из других подсемейств. И здесь есть более тесное сходство в последовательности внутри семейств.

8.4. Гены натриевых каналов

Аминокислотные последовательности Na^+-каналов варьируют более постоянно без определенного разделения на семейства. По этим критериям все девять изоформ Na^+-каналов могут быть рассмотрены как члены одного семейства. Чтобы тестировать эту гипотезу более критично, девять аминокислотных последовательностей Na^+-каналов были разделены и сравнены по их сродству, используя метод, который измеряет их эволюционную дистанцию путем подсчета числа нуклеотидных изменений, требующихся для изменения в кодоне каждой позиции (рис. 8.4, *б*). Каналы $Na_V1.1$, $Na_V1.2$, $Na_V1.3$ и $Na_V1.7$ представляют собой более тесно связанные группы, выявленные путем этого анализа. Эти четыре канала высокосенситивны к тетродотоксину и широко представлены в нейронах. Все их гены локализуются на человеческой хромосоме 2q23-24, имеющей общий эволюционный источник. Каналы $Na_V1.5$, $Na_V1.8$ и $Na_V1.9$ также тесно связаны (см. рис. 8.4, *б*), и их аминокислотные последовательности более чем на 64 % идентичны аминокислотным последовательностям предыдущих четырех Na^+-каналов, закодированных на хромосоме 2. Эти Na^+-каналы резистивны к тетродотоксину в разной степени вследствие изменений в аминокислотной последовательности в единичной позиции в домене I; они широко представлены в сердце и в нейронах ганглиев дорзальных корешков. Их гены локализованы на человеческой хромосоме 3p21-24, имеющей общий эволюционный источник. Изоформы $Na_V1.4$ представлены в основном в скелетной мышце, а $Na_V1.6$ — в основном в центральной нервной системе (см. рис. 8.4, *б*).

Хотя последовательности аминокислот более 84 % идентичны группе Na^+-каналов, чьи гены расположены на хромосоме 2 (см. рис. 8.4, *а*), их филогенетические связи намного более отдаленные (см. рис. 8.4, *б*). Настолько отдаленные эволюционные отношения совместимы с локализацией генов, кодирующих эти два Na^+-канала на хромосомах 17q23-25 и 12q13 соответственно. Уча-

стки хромосомы, несущие гены Na^+-канала, содержат много наборов связанных генов. Эти сегменты были произведены дупликацией целого генома — события в течение ранней эволюции позвоночных животных. Сравнения идентичности последовательности аминокислот, филогенетические отношения и хромосомные соотношения позволяют прийти к заключению, что все девять членов семейства Na^+-канала, которые выражены функционально, — члены единого семейства белков и появились в результате *дупликаций гена и хромосомных перестановок в процессе эволю*ции относительно недавно. Эти результаты противоположны по отношению к результатам для K^+- и Ca^{2+}-каналов, для которых отличающиеся генные семейства возникли ранее и поддерживаются как отдельные семейства.

В дополнение к этим девяти Na^+-каналам, которые были функционально охарактеризованы, к ним имели отношение специфические Na^+-канальноподобные белки, которые были клонированы от мыши, крысы и человека, но до настоящего времени не охарактеризованы функционально (Na_X). Они приблизительно на 50 % идентичны подсемейству каналов Na_V1, но больше чем на 80 % идентичны друг другу. Они имеют существенные различия в последовательности аминокислот:

1) в сенсорах напряжения;
2) инактивационных воротах;
3) области поры.

Эти различия являются критическими для функции канала. Предварительно эти Na^+-канальноподобные белки рассматривались как другое подсемейство. Эти нетипичные Na^+-канальноподобные белки представлены в клетках сердца, матки, гладкой мышцы, астроцитах и нейронах в гипоталамусе и периферической нервной системе. Из-за различия последовательности их аминокислот возможно, что эти каналы невысоко селективны для ионов Na^+ или не являются (не являются только) потенциалуправляемыми. Хотя эти белки имеют поразительные различия в последовательности аминокислот в высококонсервативных регионах Na^+-каналов, их аминокислотная последовательность больше чем на 50 % идентична другим Na^+-каналам. Они близко филогенетически связаны с группой Na^+-каналов на человеческой хромосоме 2q23-24, где также находится их ген. Успешное описание этого нетипичного Na^+-канальноподобного белка и идентификация дополнительных Na^+-каналов могут обеспечить свидетельство наличия второго подсемейства Na^+-каналов.

Три вспомогательные субъединицы Na^+-каналов были определены к настоящему времени: β_1, β_2 и β_3. Поскольку эти дополнительные субъединицы идентифицированы, предлагается, чтобы спецификация была сопоставима с той, которая принята для вспомогательных субъединиц Ca^{2+}-каналов.

8.5. Молекулярная фармакология натриевых каналов

Все фармакологические соединения, которые действуют на Na^+-каналы, имеют места или участки связывания на α-субъединице. Были идентифицированы, по крайней мере, шесть отличающихся мест связывания для нейротоксинов и один участок связывания для местных анестетиков и сходных с ними веществ, которые представлены в табл. 8.2.

Место связывания 1 связывает непептидные блокаторы поры Na^+-каналов: тетродотоксин (TTX), сакситоксин (STX) и пептидный блокатор поры μ-конотоксин (рис. 8.5). Рецепторные участки для этих токсинов сформированы аминокислотными остатками в

Таблица 8.2. **Места связывания токсинов у потенциалуправляемых Na^+-каналов**

Место связывания	*Токсин*	Домен и сегмент	*Физиологический эффект*
1	Тетродотоксин, сакситоксин, μ-конотоксин	DIS2—S6, DIIS2—S6, DIIIS2—S6, DIV S2—S6	Блок ионного канала ⇒ ингибирование ионного транспотра
2	*Вератридин,* батрахотоксин, граянотоксин, аконитин	*DIS6,* DIV S6	*Постоянная активация*
3	α-Токсины скорпиона, токсины морских анемонов, δ-атракотоксины	DIS5—S6, DIVS3—S4, *S5—S6*	Медленная инактивация; усиление постоянной *активации*
4	β-Токсины скорпиона	DIIS1—S2, DIIS3—S4	Временная повторяющаяся проходящая активность и блок ⇒ смещение потенциалзависимой активации в более негативные потенциалы
5	Бреветоксин, цигуатоксин	DIS6, DIVS5	Повторяющаяся активность; постоянная активация ⇒ смещение потенциалзависимой активации в более негативные потенциалы

Окончание табл. 8.2

Место связывания	Токсин	Домен и сегмент	Физиологический эффект
6?	δ-Конотоксин, пиретроиды и ДДТ	Не установлены	Повторяющаяся активность и/или блок; замедление активации, инактивация и дезактивация
Место связывания для местных анестетиков	Местные анестетики, антиаритмические и антиэпилептические препараты, DPI 201-106	DIS6, DIIIS6, DIVS6	Продление потенциала действия. Блок ионного канала

Тетродотоксин

Сакситоксин

Рис. 8.5. Химическая структура блокаторов поры Na^+-каналов: тетродотоксина и сакситоксина

Аконитин

Вератридин

Батрахотоксин

Граянотоксин

Рис. 8.6. Химическая структура токсинов, повышающих активацию натриевых каналов: аконитина, вератридина, батрахотоксина и граянотоксина

Делтаметрин

Перметрин

Циперметрин

Рис. 8.7. Химическая структура пиретроидов, представляющих собой аналоги природных нейротоксинов приретринов

петле поры и непосредственно на внеклеточной стороне петли поры с внешней стороны.

Место связывания 2 связывает семейство липидорастворимых токсинов, включающих аконитин (АС), вератридин (VER), батрахотоксин (ВТХ) и граянотоксин (GTX), которые поддерживают активацию натриевых каналов (рис. 8.6). Фотоаффинная маркировка и исследования мутагенеза демонстрируют трансмембранные сегменты S6 доменов I и IV в рецепторном участке для батрахотоксина.

Место связывания 3 связывает α-токсин скорпиона и токсины морских анемон, которые ингибируют инактивацию Na^+-каналов, замедляя переход Na^+-каналов, находящихся в активированном состоянии, к состоянию их инактивации. Эти пептидные токсины связываются в комплексном рецепторном участке, который включает петлю между сегментами S3 и S4 на внешнем конце сегмента S4 в домене IV.

Рис. 8.8. Химическая структура ДДТ

Место связывания 4 связывает β-токсины скорпиона, которые увеличивают активацию каналов. Рецепторный участок для β-токсина скорпиона включает петлю, соединяющую сегменты S3 и S4 на внеклеточном конце сенсора напряжения сегмента S4 в домене II.

Место связывания 5 связывает комплекс полиэфирных токсинов — бреветоксинов (PbTx) и цигуатоксин, которые продуцируют морские планктонные формы *dinoflaggelates.* В экспериментах с фотоаффинной меткой было показано, что трансмембранные сег-

Рис. 8.9. Химическая структура местных анестетиков

менты S6 домена I и S5 домена IV обеспечивают связывание бреветоксина.

Место связывания 6 связывает пиретроиды, представляющие собой аналоги природных нейротоксинов приретринов (рис. 8.7), ДДТ (рис. 8.8) и δ-конотоксины, которые замедляют скорость инактивации подобно α-токсину скорпиона. Местоположение нейротоксинового рецепторного участка 6 неизвестно.

Наконец, местные анестетики (рис. 8.9), вещества, родственные антиэпилептикам, и антиаритмические вещества связывают перекрывающиеся рецепторные участки, расположенные во внутренней полости поры натриевого канала. Аминокислотные остатки в сегментах S6 по крайней мере в трех из четырех доменов вносят вклад в этот сложный комплекс рецепторного участка к соединению, при этом доминирующую роль играет сегмент S6 домена IV.

Далее будут рассматриваются вопросы основных молекулярных, физиологических и фармакологических свойств для каждого из девяти Na^+-каналов, которые были функционально охарактеризованы. Будут представлены данные, характеризующие процессы потенциалзависимой активации и инактивации каналов. Будут рассматриваться проводимость единичного канала и обсуждаться вопросы связывания нейротоксинов и других веществ.

8.6. Молекулярная организация ворот канала

Большинство данных о функциональных аспектах ворот канала были получены на основе экспериментов с мутагенезом. В настоящее время существует не так много данных об активации и структурах, вовлеченных в этот процесс. Больше известно о потенциалчувствительности Na^+-канала. Инактивация воротного механизма изучена несколько лучше.

Внешнее устье канала и селективный фильтр. Модель внешнего входа поры демонстрирует две основные структуры: селективный фильтр и место связывания для определенной группы токсинов. Именно гуанидиновые токсины TTX и STX были важным инструментом в исследовании формы и структуры внешнего устья Na^+-каналов. Комбинация кристаллографического определения их структуры и различные эксперименты с мутациями значительно улучшили понимание механизма проницаемости канала. Хотя структуры, определяющие селективность Na^+-канала и разнообразие изоформ, участвующих в связывании токсинов, функционально и топологически не отделимы, мы обсудим этот последний вопрос в деталях позднее в главе, посвященной месту связывания 1. Сейчас сосредоточим свое внимание только на структурах, обеспечивающих селективность канала.

Исследуя проникание ряда маленьких катионов и молекул, Б. Хилле (B. Hille) был первым, кто оценил размер Na^+-канала. Использование молекулярного моделирования дало возможность подтвердить эти результаты. Если можно было бы заглянуть с внеклеточной стороны в пору, то мы могли бы увидеть широкое устье диаметром около 1,2 нм и следующее за ним сужение Na^+-канала до 0,3—0,5 нм. Эта структура соответствует предполагаемому селективному фильтру для иона (см. рис. 8.2, *б*, *в*). Один участок из четырех аминокислотных остатков, расположенных в этой области, а именно аспарагиновой кислоты, глицина, лизина и аланина (так называемый DEKA-локус), формирует самую узкую часть поры, действуя как селективный фильтр. Вместе с большим количеством внеклеточно расположенных остатков глутаминовой кислоты глутаминовая кислота, метионин и аспарагиновая кислота, вероятно, вовлечены в проводимость Na^+-канала, селективность и связывание токсинов. Все упомянутые аминокислоты, принадлежащие двум участкам, расположенные эквивалентно, образуя четыре повтора, формируют трехмерный кластер, который расположен в пределах сегмента, названного SS2 или Р-петля (Р-сегмент).

Последующие результаты показывают, что остаток лизина в домене III Na^+-канала играет основную роль в дифференцировании между одновалентными ионами Na^+ и K^+ и единственным из всех двухвалентных ионов — Ca^{2+}. Точный механизм, на основании которого канал узнает свой ион среди различных катионов, остается неясным.

Идея, касающаяся трансмембранного пути иона, который сформирован внеклеточными петлями между сегментами S5 и S6 каждого домена, существовала уже в течение многих лет. Базируясь на экспериментальных исследованиях блока Na^+-канала токсинами и доступными данными относительно точечных мутаций, Г. М. Липкинд (G. M. Lipkind) и Г. А. Фоззард (H. A. Fozzard) предложили модель внешнего устья канала. Эта модель предполагает существование связывающего ТТХ и STX кармана (углубления), образованного из антипараллельных β-изгибающихся участков (принцип шпильки для волос — hairpins), которые расположены во внеклеточных петлях, сязывающих сегменты S5 и S6 во всех четырех доменах. Одна секция каждой петли — это Р-сегмент (SS2), имеющий постоянную последовательность аминокислот и составляющий часть внешнего устья поры и селективного фильтра. Однако некоторые аспекты этой модели были недавно пересмотрены.

Сенсор напряжения и активация. Воротный механизм, т. е. изменение между непроводящим и проводящим состоянием канала, является ответом на изменение потенциала. Этот процесс имеет место во всех потенциалуправляемых каналах возбудимых клеток.

Например, изменения мембранного потенциала клеток сердца контролируются пейсмейкерными клетками. Потенциалуправляемые каналы, которые находятся в мембране клетки, отвечают на такое изменение потенциала изменениями конформации. Уже после клонирования первого Na^+-канала был идентифицирован возможный сенсор напряжения. Общий критерий для сенсора напряжения — наличие заряженных остатков аминокислот, расположенных в пределах электрического поля. Эта особенность была показана В. Нода и соавторами (W. Noda et al.) в предполагаемых α-спиральных трансмембранных сегментах клонированного Na^+-канала. Сегмент S4 (см. рис. 8.2, *а*) в каждом из четырех доменов α-субъединицы содержал аргинин или лизин, оба из которых были положительно заряжены в каждой третьей позиции. В Na^+-канале мозга крысы есть пять таких остатков в сегментах S4 доменов I и II, шесть — в сегменте S4 домена III и восемь в сегменте S4 домена IV. Это число более или менее постоянно в разных типах Na^+-каналов. Так как сегменты S4 являются трансмембранными, они лежат в пределах электрического поля и являются хорошими кандидатами на роль сенсора напряжения. Эта гипотеза также поддерживалась данными о том, что аналогичные паттерны найдены и в других потенциалуправляемых каналах. Эксперименты с направленными мутациями подтвердили, по крайней мере, частично, это свойство сегмента S4. Подобные результаты были получены для сегмента S4 потенциалуправляемого K^+-канала. Несколько остатков аргинина и лизина у сегментов S4 доменов I и II были заменены нейтральными или отрицательно заряженными остатками аминокислот. Когда сегмент S4 у домена I был видоизменен мутацией, это привело к уменьшению зависимости между вероятностью открытия канала и мембранным потенциалом. Этот эффект был намного меньшим, когда сегмент S4 был видоизменен мутацией у домена II. Эффект мутаций у сегмента S4, несущего положительный заряд, был также изучен в плане корреляции с быстрой инактивационной кинетикой. Можно сделать заключение, что все сегменты S4 вовлечены в оба процесса: активацию и инактивацию, однако отдельные сегменты S4 разных доменов играют различные роли в обоих процессах.

Точное понимание конформационных изменений, ассоциирующихся с активацией, затруднено из-за ограниченности данных и трудности в определении прямого вовлечения различных остатков аминокислот.

Внутреннее устье канала и инактивационные ворота. После активации Na^+-канала проницаемость для ионов Na^+ быстро повышается и затем падает на фоне ступеньки деполяризации. За это уменьшение Na^+-тока ответственна инактивация Na^+-каналов. По сравнению с состоянием покоя канала, при котором также отсутствует проводимость Na^+-канала, инактивация — это процесс,

с помощью которого Na^+-канал становится недоступным повторному открытию до окончания фазы реполяризации мембраны.

В настоящее время известны, по крайней мере, два способа инактивации Na^+-канала: медленная, которая развивается за время от секунды до минут, и быстрая, временнóй масштаб которой равен миллисекундам. Относительно мало известно о медленной инактивации. Напротив, механизм, вовлеченный в быструю инактивацию, изучен достаточно хорошо.

В течение довольно долгого времени было известно, что цитоплазматическая петля канала может быть вовлечена в его инактивацию. Позднее было показано, что внутриклеточная петля между доменами III и IV может быть этими инактивационными воротами. Эта петля изображена на рис. 8.2, *а—в*. Уже тот факт, что это большая соединительная петля имеет сходную последовательность у различных Na^+-каналов, подчеркивает ее физиологическую важность. Первое прямое свидетельство роли региона DIII — DIV-линкера как инактивационных ворот было получено на основе экспериментов.

Был сделан ряд мутантных клонов. Среди них выявили два клона. В первом клоне между доменами III и IV часть последовательности аминокислот была вырезана. Во втором клоне между доменами III и IV часть последовательности аминокислот была вырезана и заменена другой. Оба этих клона характеризовались выраженным уменьшением скорости инактивации. Результаты были подтверждены и другой группой исследователей, которая использовала ингибирование инактивации антителами, направленными против этой области. После идентификации этого внутриклеточного региона в качестве инактивационных ворот был найден кластер гидрофобных аминокислот, который играет решающую роль. Этот кластер, содержащий изолейцин-1488, фенилаланин-1489 и метионин-1490 (IFM-последовательность), был идентифицирован как фрагмент, необходимый для инактивации Na^+-канала.

Позже было показано, что небольшие пептиды, содержащие IFM-последовательность, достаточны для создания быстрой инактивации Na^+-канала с мутациями в доменах III и IV соединяющей петли. Эти данные позволили предположить, что повторяющиеся IFM-последовательности блокируют пору Na^+-канала, создавая инактивацию за счет связывания друг с другом. Эта гипотеза подразумевает присутствие аминокислотных остатков во внутриклеточном устье поры Na^+-канала, которые вовлечены в конформационные изменения, объединяющие процессы активации и инактивации между собой благодаря связыванию IFM-последовательностей, что приводит к результату в виде инактивированного состояния канала. Эту часть канала обычно называют инактивационным линкером, или инактивационным рецептором, или со-

стыковывающимся участком — доком (docking site) инактивационных ворот.

При использовании метода поиска и замены остатков (scanning mutagenesis) было обнаружено, что несколько остатков аминокислот локализуются в коротком соединении между сегментом S4 и сегментом S5 доменов III и IV, расположенным в области внутреннего устья канала. Они играют основную роль в закрытии ворот и процессе связывания. Было предложено, что IFM-последовательности инактивационных ворот взаимодействуют с F1651 и/или L1660 (в мозге крысы αII Na^+-канал) в петле S4—S5 домена IV в течение инактивации закрытого канала. Кроме того, показано, что трансмембранный сегмент S6 домена IV существенен для инактивации, однако пептид, содержащий IFM-последовательности из инактивационных ворот, может все еще восстанавливать инактивацию в каналах, имеющих мутации в этом регионе (F1764A и V1774A). Авторы сделали заключение, что эти остатки непосредственно не взаимодействуют с инактивационными воротами, т.е. не функционируют как состыковывающийся участок для IFM-последовательности.

Первая демонстрация прямого взаимодействия, совместимая с моделью состыковывающегося сайта (docking site model), была показана с помощью мутационных экспериментов в пределах короткой соединительной петли между сегментами S4 и S5 домена III. Результаты продемонстрировали, что высококонсервативный (постоянно присутствующий) аланин в позиции 1329, принадлежащей к сегментам S4 и S5 домена III, является важным остатком для нормальной инактивации. Более детальное исследование сегментов S4 и S5 домена IV с использованием метода поиска и замены остатков, предполагает что F1651, L1660 и N1662 играют главную роль в процессе инактивации. Остатки F1651 и/или L1660, как предполагается, взаимодействуют с IFM-последовательностью инактивационных ворот.

В 1999 г. были опубликованы первые данные для Na^+-каналов, полученные с высоким разрешением. Авторы клонировали и экспрессировали часть предполагаемых инактивационных ворот и решили вопросы структуры методом ядерного магнитного резонанса. Они показали, что инактивационные ворота представляют собой α-спиральную структуру, заканчивающуюся N-терминальным поворотом. Эти данные представляют собой первое сообщение, полученное с высоким разрешением для Na^+-каналов.

В то же время молекулярный механизм медленной инактивации Na^+-каналов остается неясным. Этот физиологически важный, но плохо понятый процесс характерен для всех Na^+-каналов. Медленная инактивация, как полагают, играет важную роль в возбуждении мембраны и механизмах генерации потенциалов действия. Она участвует в различных физиологических и патофизио-

логических процессах. Хотя медленная инактивация может играть только незначительную роль в условиях нормальной деятельности сердца, она в то же время играет более важную и физиологически необходимую роль в клетках мозга и мышцах. Известны несколько наследственных болезней, в основу которых вовлечены дефекты медленной инактивации Na^+-каналов. К подобным заболеваниям, например, относятся патологии типа периодического паралича (periodic paralysis).

Известно, что медленная инактивация Na^+-каналов клеток сердца крайне ограничена (практически не выявляется) по сравнению, например, с медленной инактивацией Na^+-каналов в нерве и скелетной мышце. Эти данные представляют важное физиологическое различие между Na^+-каналами клеток сердца и другими подтипами Na^+-каналов. Как и в случае быстрой инактивации, медленная инактивация изоформы (SkM1) скелетной мышцы, но не изоформы сердечной мышцы (HH1), модулируется β_1-субъединицей. Механизмы этой модуляции пока еще не известны. Предполагается, что P-петли могли бы быть структурными детерминантами этого процесса посредством взаимодействия с β_1-субъединицей.

Полагают, что медленная и быстрая инактивация — независимые события. Эта точка зрения основывается на том факте, что внутриклеточная инъекция протеолитических ферментов устраняет быструю инактивацию, но не затрагивает медленную инактивацию. Неизвестно, есть ли медленные инактивационные ворота, как это имеет место в механизме быстрой инактивации. Однако IFM-последовательность, которая играет важную роль в процессах быстрой инактивации, также определяет медленную инактивацию, которая зависит от времени открытия канала (медленную use-dependent инактивацию), когда аппликация осуществляется с цитоплазматической стороны. Было высказано предположение, что быстрая инактивация представляет собой связывание инактивационных ворот с рецептором инактивационных ворот, расположенным в короткой соединяющей петле между сегментами S4 и S5 домена IV, в то время как медленная инактивация обусловлена связыванием IFM-пептида в глубине поры. В то же время есть взаимосвязь между внешним устьем поры и процессом медленной инактивации. Мутация аминокислотного остатка внешней стенки поры оказывала действие на медленную инактивацию. Мутация отдельного остатка аргинина в трансмембранном сегменте S6 домена I (S6DI) также выраженно изменила медленную инактивацию канала. По этим причинам было предложено применить принцип инактивации C-типа K^+-канала Shaker также и для Na^+-каналов. Другая точечная мутация в трансмембранном сегменте S2 домена IV изменила и активацию, и инактивацию Na^+-каналов. Медленная инактивация была также повреждена му-

тациями, локализованными на цитоплазматической стороне канала.

Медленная и быстрая инактивации также отличаются по кинетике и steady-state уровню медленной инактивации и подвержены влиянию изменения концентрации внеклеточных катионов щелочных металлов и органических катионов. Под влиянием органических катионов нарушение кинетики происходит быстрее, чем под влиянием катионов щелочных металлов. В противоположность быстрой инактивации, которая менее чувствительна к изменениям $[Na^+]_{out}$, повышение концентрации внеклеточных катионов ингибирует медленную инактивацию. Эти результаты вместе с мутационными экспериментами в пределах внешней канальной поры показывают, что конформационные изменения в течение медленной инактивации могут зависеть от оккупации предполагаемого Na^+-связывающего участка во внешнем устье канала. Создание химер на основе канала клеток сердца человека и канала скелетной мышцы крысы показало, что все четыре домена могут модулировать медленную инактивацию Na^+-каналов, но домены III и IV, как было показано, менее важны, чем домен I или II. Будущие эксперименты в этом направлении могут позволить идентифицировать структуру, вовлеченную в медленную активацию, так же как структуры, передающие взаимодействие между быстрой и медленной инактивацией.

8.7. Роль модификации потенциалуправляемых Na^+-каналов

8.7.1. Общие представления о потенциалуправляемых Na^+-каналах

Воротные свойства Na^+-каналов могут модулироваться, или модифицироваться, в основном ацилированием жирными кислотами, гликозилированием, фосфорилированием и сульфированием.

Две химические реакции — ацетилирование и ацилирование — затрагивают терминали остатков (рис. 8.10, *а*). Ацетилирование — это добавление CH_3CO группы к аминогруппе N-терминали остатка. Химически более сложная модификация представляет собой ацилирование жирными кислотами, т.е. ковалентное прикрепление жирной кислотной группы липида к N-терминали (рис. 8.10, *а*). Такой липидный хвост функционирует для заякоревания протеина к липидному бислою клеточной мембраны (рис. 8.11).

Внутренние остатки в протеинах могут быть модифицированы прикреплением различных химических групп к концам их цепей.

Ацетилирование N-терминалей $CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\underset{H}{\underset{|}{N}}-\overset{R}{\overset{|}{\underset{H}{\underset{|}{C}}}}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-$

Ацилирование N-терминалей $CH_3-(CH_2)_{14}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\underset{H}{\underset{|}{N}}-\overset{R}{\overset{|}{\underset{H}{\underset{|}{C}}}}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-$

а

3-Гидроксипролин

OH
H_2C-CH
$H_2C\quad CH-COO^-$
$^+NH_2$

4-Гидроксипролин

OH
$HC-CH_2$
$H_2C\quad CH-COO^-$
$^+NH_2$

3-Метилгистидин

$HC{=}C-CH_2-CH-COO^-$
$H_3C-N\quad N\quad NH_3^+$
C
H

5-Гидроксилизин $^+H_3N-CH_2-CH-CH_2-CH_2-CH-COO^-$
$OH \qquad NH_3^+$

γ-Карбоксиглутамат

^-OOC
$CH-CH_2-CH-COO^-$
$^-OOC \qquad NH_3^+$

б

Рис. 8.10. *Примеры химической модификации* аминокислотных остатков у белков. Эта модификация происходит после синтеза полипептидной цепочки. В каждом случае замещаемая или подшиваемая группа (выделена заливкой) имеет замененный водородный ион:

а — модификация терминалей остатков; N-терминальный конец может быть модифицирован ацетилированием и ацилированием жирными кислотами; *б* — модификация внутри остатков; остатки могут быть модифицированы гидроксилированием, метилированием и карбоксилированием

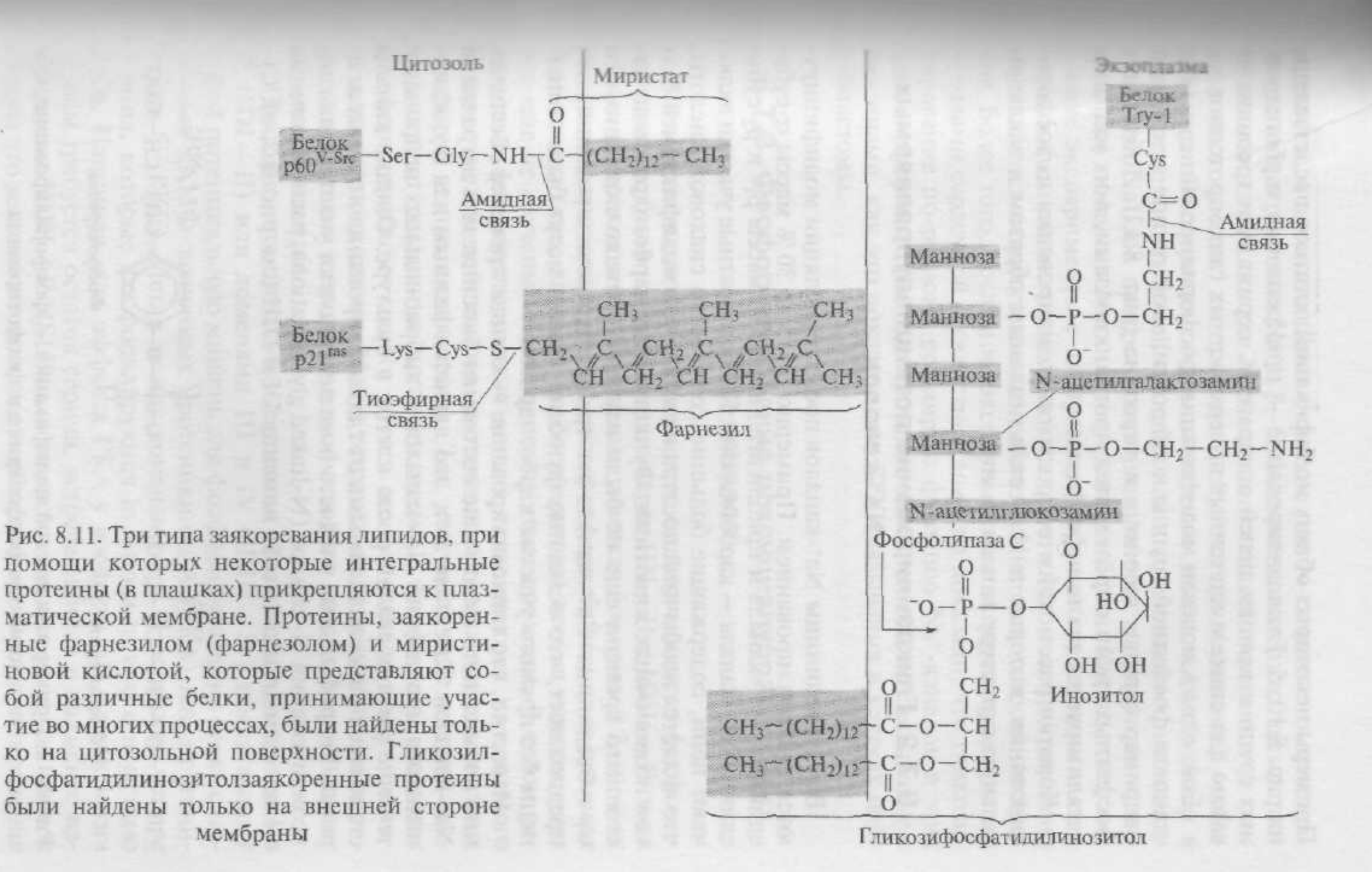


Рис. 8.11. Три типа заякоревания липидов, при помощи которых некоторые интегральные протеины (в плашках) прикрепляются к плазматической мембране. Протеины, заякоренные фарнезилом (фарнезолом) и миристиновой кислотой, которые представляют собой различные белки, принимающие участие во многих процессах, были найдены только на цитозольной поверхности. Гликозилфосфатидилинозитолзаякоренные протеины были найдены только на внешней стороне мембраны

Примеры некоторых общих модификаций остатков представлены на рис. 8.10, *б*. Гликозилирование — прикрепление карбогидратных групп к концам цепей аспарагина, серина или треонина — важно для синтеза клеточных поверхностных гликопротеинов.

Еще одна ключевая модификация фосфорилирование — подстановка фосфатной группы к гидроксильной группе в остатках, например серина, треонина и тирозина (рис. 8.12). Добавление фосфатных групп определяется протеинкиназами, а их удаление катализируется протеинфосфатазами.

Коротко рассмотрим вопросы гликозилирования и фосфорилирования, которые вносят вклад главным образом в заключительную структуру канала in vivo.

8.7.2. Гликозилирование потенциалуправляемых Na^+-каналов

Все субъединицы Na^+-каналов после трансляции модифицируются гликозилированием. Примерно от 15 до 30 % массы α-субъединицы Na^+-канала и приблизительно 25 % массы β_1- и β_2-субъединиц Na^+-канала — карбогидраты. Карбогидратные участки включают цепи, содержащие большие количество сиаловой кислоты, что является необычной посттрансляционной модификацией белков позвоночных животных. Функции этих карбогидратов до настоящего времени еще не были изучены. Однако показано, что α_1-субъединица Ca^{2+}-канала не требует гликозилирования, это предполагает, что основные функции канала могут быть выполнены без прямого участия карбогидратов.

Известно, что гликозилирование — основа процесса обеспечения нормального steady-state состояния биосинтеза и деградации Na^+-каналов. Как полагают, это является важным для функционального проявления Na^+-каналов в эмбриональных нейронах в течение ранних стадий роста клеток в культуре. Однако каналы становятся менее зависимыми от гликозилирования в зрелых нейронах. Гидрофильные внеклеточные петли имеют участки для гликозилирования N-концов (N-linked glycosylation), расположенные между сегментами S5 и S6 доменов DI и DIII (см. рис. 8.2, *а*). Су-

$$^{-}O-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{\underset{\underset{\displaystyle O^-}{|}}{P}}-O-CH_2-\overset{\overset{\displaystyle NH_3^+}{|}}{CH}-COO^-$$

Фосфосерин

$$^{-}O-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{\underset{\underset{\displaystyle O^-}{|}}{P}}-O-C_6H_4-CH_2-\overset{\overset{\displaystyle NH_3^+}{|}}{CH}-COO^-$$

Фосфотирозин

Рис. 8.12. Пример химической модификации — фосфорилирование. Образование фосфосерина и фосфотирозина

ществует 14 потенциальных участков для N-связанного гликозилирования в регионах HH1. β_1-Субъединица содержит четыре потенциальных участка для N-связанного гликозилирования во внеклеточном домене, которые не требуются для функции β_1-субъединицы. Эксперименты, выполненные методом patch-clamp в конфигурации whole-cell на нейронах неонатальных крыс, показали, что Na^+-ток прогрессивно уменьшается в присутствии ингибитора процесса N-гликозилирования белка. Кроме того, недавние эксперименты с экспрессированными сердечными и скелетными каналами мышцы показали, что Na^+-ток прогрессивно уменьшается в присутствии ингибитора N-гликозилирования белков. Более того, последние эксперименты с экспрессированными каналами сердечной и скелетной мышцы показали, что гликозилирование по-разному регулирует функцию Na^+-каналов в этих двух изоформах. Гликозилирование может влиять на связывание с токсинами, как это показано для STX связывания в клетках нейробластомы.

8.7.3. Фосфорилирование потенциалуправляемых Na^+-каналов

Последовательности аминокислот, подвергающиеся фосфорилированию, были найдены на линкерах IDI—II и IDIII—IV и на обоих внутриклеточных концевых участках (см. рис. 8.2, *а*). Как полагают в настоящее время, роль фосфорилирования в функции Na^+-канала (как, впрочем, любого другого) весьма важная, хотя все еще не изучены многие аспекты этого процесса. В целом результаты фосфорилирования канала складываются из сложного баланса между действиями протеинкиназ (различных киназных изоформ) и протеинфосфатаз. Так как различные клетки экспрессируют различные протеинкиназы и фосфатазы, механизм фосфорилирования одного и того же Na^+-канала может различаться у разных клеток. Могут встречаться даже различные варианты механизма в пределах одной и той же клетки, если внешние условия изменены.

Показано, что цитозольные участки петли между доменами I и II (IDI—II) или доменами III и IV (IDIII—IV) представляют собой потенциальную мишень для фосфорилирования белка с помощью цАМФ-зависимых протеинкиназ А (PKA) или протеинкиназ С (PKC). Петля между доменами I и II содержит четыре серина, которые фосфорилируются in vitro и in vivo с помощью PKA. Например, для эффекта PKA у изоформ αII клеток мозга крысы требуется остаток серина, встречающийся в наименее изменчивом IDIII—IV (S1506), в то время как для изоформ клеток сердца это условие не является необходимым. Фосфорилирование

этого участка требуется для того, чтобы замедлять инактивацию Na^+-канала и уменьшить пиковый ток с помощью РКС.

Показано, что РКА модулирует Na^+-каналы индивидуально у различных изоформ; РКА-обусловленное фосфорилирование показано биохимическими методами для ряда изоформ Na^+-каналов нейронов, скелетной мышцы и сердца. В петле между доменами I и II Na^+-канал клеток сердца имеет восемь кандидатов в качестве участков фосфорилирования с помощью РКА. Все они отличаются от участков фосфорилирования Na^+-канала нейрона. Исследования экспрессии Na^+-канала клеток сердца in vitro демонстрирует цАМФ-зависимое фосфорилирование только на двух из этих серинов.

Функциональное значение активации РКА было также изучено на различных гетерологичных экспрессируемых изоформах. Активность изоформы αII у нейронов уменьшается под влиянием стимуляции РКА форсколином или изопротеренолом. В противоположность уменьшению активности у изоформ в нейронах изоформы RH1 клеток сердца стимулируются РКА, а токи канала скелетной мышцы (SkM1) остаются неизменными. Другими словами, РКА и РКС имеют одинаковые эффекты на изоформу αII: это так называемая *конвергентная* (сходящаяся в одной точке) *модуляция.* В то время как Na^+-каналы клеток сердца модулируются противоположно с помощью РКА и РКС — это так называемая *дивергентная* (расходящаяся) *модуляция*.

Многие Ca^{2+}- и K^+-каналы также регулируются путями, вовлекающими фосфорилирование белка. Предполагают, что долгосрочная модуляция функции ионного канала фосфорилированием — широко распространенный регулирующий механизм. Также вероятно, что различные пути фосфорилирования обеспечивают, по крайней мере частично, функциональные различия между изоформами каналов.

8.8. Места связывания потенциалуправляемых Na^+-каналов

8.8.1. Общая характеристика мест связывания

Большое количество биологических токсинов оказывают свой токсический эффект, модифицируя свойства Na^+-каналов:

1) растворимые в воде гетероциклические гуанидиновые соединения — тетродотоксин и сакситоксин;

2) липидорастворимые полициклические соединения: вератридин, аконитин и батрахотоксин (ВТХ);

3) яды, представляющие собой низкомолекулярные полипептиды, изолированные из скорпиона, морских анемонов и др.

Согласно их связывающим свойствам определены пять групп токсинов (см. рис. 8.2, *в* и табл. 8.2).

После появления данных об этих участках Б. Хилле предложил наглядную схему взаимодействия токсинов с белком канала (рис. 8.13). Эта схема и до настоящего времени позволяет читателям, не обладающим специальной молекулярно-биологической подготовкой, понять, в каком месте канала происходит взаимодействие с теми или иными токсинами.

Начиная обсуждать места связывания, напомним, что место 1 связывает TTX, STX и μ-конотоксин, которые блокируют проводимость ионов. Место 2 связывает BTX, вератридин и аконитин, что заканчивается постоянной активацией Na^+-канала. Место 3 связывает α-токсины скорпиона и токсины морских анемонов, которые замедляют или блокируют инактивацию. Соединения, кото-

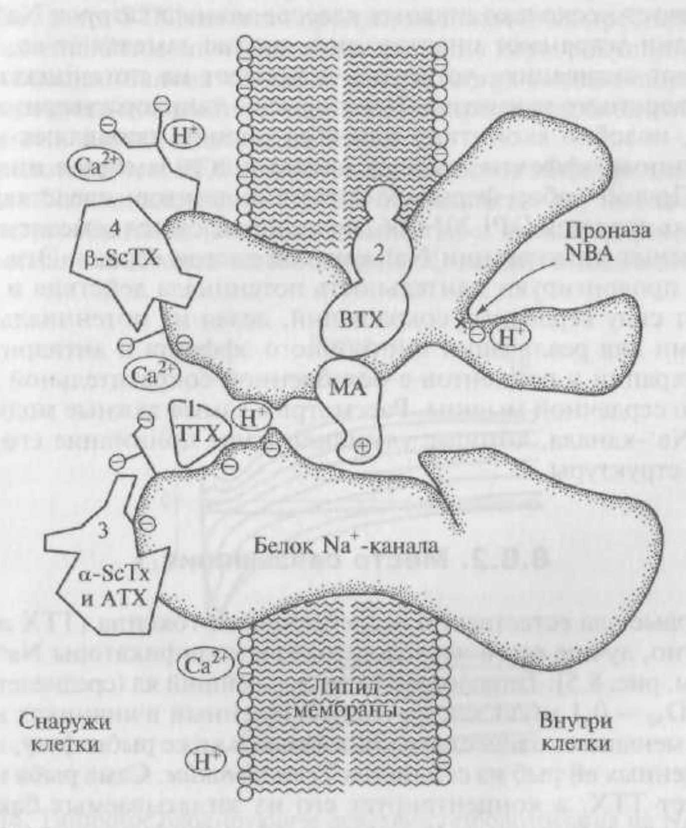


Рис. 8.13. Гипотетическое распределение различных мест связывания токсинов на модели белковой структуры Na^+-канала:

1—4 — места связывания; MA — предполагаемое место связывания местных анестетиков

рые связываются на этом участке, также увеличивают постоянную активации Na^+-каналов, вызванную токсинами, действующими на рецептор места 2. Место 4 связывает β-токсины скорпиона, что смещает потенциалзависимость процесса активации в область более негативных потенциалов мембраны, не изменяя инактивацию Na^+-каналов. Наконец, место 5 связывает бреветоксин и цигуатоксин, вещества, которые вызывают повторяющуюся пачечную активность нейрона, сдвигая потенциалзависимость и блокируя инактивацию Na^+-каналов. На ворота каналов также влияют другие процессы: изменения концентрации внеклеточных двухвалентных ионов, pH и ионной силы. Неизвестно никакой прямой химической модификации активации.

Позднее было предложено еще одно место связывания 6, которое связывает инсектициды.

Как показано Б. Хилле и представлено в суммарной табл. 8.2, существует несколько главных классов модификаторов Na^+-каналов: одни устраняют инактивацию, другие замедляют ее, третьи смещают активацию, четвертые действуют на потенциалзависимость воротного механизма. Некоторые из липидорастворимых токсинов, подобно аконитину или вератридину, проявляют комбинированные эффекты, смещая активацию и замедляя инактивацию. Другой набор фармакологических агентов, представителем которых является DPI 201-106, использовался для замедления или устранения инактивации Na^+-каналов клеток сердца. Эти соединения пролонгируют длительность потенциала действия и увеличивают силу сердечных сокращений, делая их потенциально полезными для реализации инотропного эффекта и антиаритмической терапии у пациентов с ослабленной сократительной активностью сердечной мышцы. Рассмотрим самые важные модификаторы Na^+-канала, которые улучшили наше понимание его функций и структуры.

8.8.2. Место связывания 1

Первые два естественно встречающихся токсина (TTX и STX), вероятно, лучше всего исследованы как модификаторы Na^+-каналов (см. рис. 8.5). Тетродотоксин — сильнейший яд (среднелетальная доза LD_{50} — 0,1 мг/кг массы тела), найденный в яичниках и печени и в меньшем количестве в кишечнике и коже рыбы фугу, а также родственных ей рыб из семейства *Tetraodontidae*. Сама рыба не синтезирует TTX, а концентрирует его из заглатываемых бактерий. Рестораны в Японии и Корее подают рыбу фугу как деликатес после удаления ядовитых органов, однако каждый год от Новой Гвинеи до Японии, Таиланда и Вьетнама происходит много фатальных случаев. Общее количество смертельных случаев в год

оценивают как 120. Кроме того, есть интересная этнологически-фармакологическая связь между отравлением ТТХ и колдовством на Гаити; он был главным активным фармакологическим компонентом, ответственным за введение человека в состояние каталепсии — оцепенения. Тетродотоксин был выделен из порошка, используемого в колдовских ритуалах, который был приготовлен методами экстракции из различных животных (рыбы, лягушки) и растений.

Сакситоксин, подобно ТТХ, является блокатором активации Na^+-каналов и известен также как паралитический яд моллюска (PSP: paralytic shellfish poison). Этот токсин, найденный в некоторых моллюсках, членистоногих, иглокожих и некоторых других морских животных, которые заглатывали протисты (простейшие одноклеточные организмы), главным образом *Dinoflagellata* — одноклеточный организм в морском планктоне, который содержит яд. Кроме того, STX является продуктом некоторых пресноводных *Cyanobacteria*. Этим способом фильтрующие корм ракушки, рыбы или моллюски становятся ядовитыми и могут вызвать паралитическое ракушечно-рыбное отравление при потреблении пищи домашними животными и человеком.

Тетродотоксин и STX — возможно, наиболее специфичные токсины для Na^+-каналов (рис. 8.14). В большинстве случаев связывание быстро обратимо (секунды и минуты) и высокоаффинно. Их равновесная константа диссоциации K_d лежит в диапазоне 1—

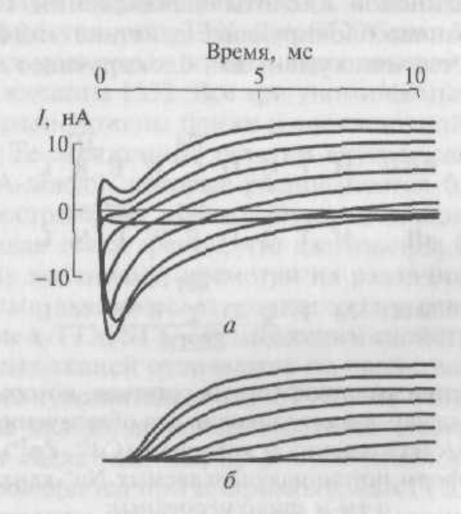


Рис. 8.14. Типичное блокирующее действие тетродотоксина на Na^+-ток:
а — контроль: суммарный ток, включающий входящий Na^+-ток и выходящий ток, возникающий при разных ступенях деполяризации относительно поддерживаемого потенциала; *б* — полное ингибирование входящего Na^+-тока тетродотоксином в концентрации 300 нмоль/л

10 нмоль/л для изоформ скелетной мышцы или нервных клеток, а для менее чувствительных сердечных Na^+-каналов — в диапазоне нескольких микромолей. Два гуанидиновых токсина и их структурные аналоги были ценными инструментами как для исследования формы и структуры внешнего устья, так и для моделирования TTX/STX-связывающего участка. Изучение связывания с STX предполагает, что β_1-субъединица также участвует в формировании TTX/STX-связывающего участка.

В комбинации с экспериментами направленных мутаций (site-directed mutation) стало возможно получение более четкой картины этой части канала. Для лучшего понимания аминокислотная последовательность этой области от трех изоформ Na^+-каналов показана на рис. 8.15. Единственная точечная мутация, связанная с заменой глутаминовой кислоты 387 в сегменте SS2 (или P-сегменте) DI изоформы II из мозга крысы (AC X03639) на глутамин (E387Q), привела к полной потере блокирующего действия TTX и STX. Впоследствии были выполнены систематические мутации, главным образом заряженных остатков, в сегментах SS2 всех четырех повторов. Различные мутации в разной степени изменяли чувствительность к блокирующему действию TTX и STX, однако нейтрализация любого из шести сохраненных остатков глутаминовой или аспарагиновой кислоты уменьшала чувствительность минимум в 3 раза. Тетродотоксин взаимодействовал прежде всего с остатками в сегментах доменов I и II. Относительно STX нейтрализация аспарагиновой кислоты в положении 1717 домена IV (D1717N9) устраняла блокирующее действие этого токсина, в то же время лишь частично уменьшая блокирующее действие TTX.

```
             374     377
RH1   M T Q D C W E R L

             385  387 388
αII   M T Q D F W E N L

             401
SkM1  M T Q D Y W E N L
             SS2DI
```

Рис. 8.15. Положения аминокислотных остатков, которые были идентифицированы как главные составляющие для обеспечения сенситивности к тетродотоксину/сакситоксину и катионам (Cd^{2+}, Zn^{2+}) и различающиеся у разных изоформ потенциалуправляемых Na^+-каналов (подчеркнуты и пронумерованы):

SS2DI — сегмент, принадлежащий соединяющей петле между S5 и S6 в DI и вносящий вклад вместе с соответствующими сегментами от других повторов в место связывания TTX/STX и селективный фильтр; RH1 — изоформа 1 Na^+-канала клеток сердца крысы; αII — изоформа 2 Na^+-канала клеток мозга крысы; SkM1 — изоформа 1 Na^+-канала скелетной мышцы

Общепринятая точка зрения заключалась в том, что TTX и STX связывают один и тот же участок в канале. Эта идея базировалась на различных фактах подобно тому, что два токсина полностью блокируют ток, конкурируя друг с другом в экспериментах со связыванием. Они близки по размерам, обладают сходными функциональными группами, и мутации во внешнем устье, вероятно, оказывают качественно подобные эффекты на аффинность обоих токсинов. Все эти сходства позволили предположить молекулярную модель TTX- и STX-связывающего кармана (углубления), образованного антипараллельно идущими β-поворотами, сформированными из пептидных сегментов четырех S5—S6 внеклеточных петель Na^+-каналов. В то же время некоторые недавние экспериментальные результаты позволяют несколько изменить эти представления.

Для объяснения разногласий, касающихся специфического взаимодействия между устьем канала и двумя токсинами, было проведено количественное сравнение эффектов мутаций на восьми основных участках устья канала. Для этого исследования использовали изоформы Na^+-каналов скелетной мышцы (μ1 или SkM1), экспрессированные в ооциты *X. laevis*. Результаты показали, что самые выраженные различия между TTX- и STX-блоком были получены при мутации остатка тирозина в положении 401. Эффекты мутации были более выражены при замене аспарагиновой кислоты, чем при замене цистеина. В то же время мутации в этом положении затрагивали блокирующую эффективность STX в значительно меньшей степени, чем эффективность TTX. Для STX-блока были более важны два внешних кольцевых остатка глутаминовой кислоты 758 и аспарагиновой кислоты 1532. Все три упоминаемых остатка (Y401, E758 и D1532) расположены ближе к внеклеточной части внешнего устья поры. Те заряженные остатки внутреннего селективного региона (DEKA-локус), которые располагаются ближе к внутриклеточному пространству, взаимодействуют сходно и с STX, и с TTX, поддерживая точку зрения, что два токсина блокируют пору по одинаковому механизму, несмотря на различия во взаимодействии с остатками аминокислот, расположенными вокруг поры.

В дополнение к TTX/STX-связывающим свойствам Na^+-каналы клеток различных тканей отличаются по свойствам, касающимся непосредственно чувствительности к TTX. Na^+-каналы клеток сердечной мышцы являются менее чувствительными, чем каналы клеток мозга и скелетных мышц. У этих каналов блокирующий эффект TTX проявляется при микромолярных (TTX-резистивные, или TTX-R) вместо наномолярных (TTX-сенситивные, или TTX-S) концентраций.

Первая гипотеза, которая объясняет высокую/низкую аффинность TTX и STX связывания у Na^+-каналов, строилась на основе электростатического притяжения между положительно заряжен-

ными гуанидиновыми группами и отрицательно заряженными кислотными группами в участке их связывания в канале. Изоформы каналов клеток сердца и мозга имеют только два различных остатка в петле P. Первое отличие касается наличия цистеина в положении 374 в изоформе канала клеток сердца (RH1) вместо фенилаланина-385 в изоформе канала клеток мозга (αII) или тирозина-401 в каналах скелетной мышцы (SkM1). Второе отличие касается присутствия остатка аргинина в положении 377 (у RH1) вместо аспарагина (положение 388 у αII или положение 404 у μ1).

Для доказательства более поздней гипотезы были получены мутации N388R в изоформах канала клеток мозга и R377N в изоформах канала клеток сердца. Эти эксперименты исключили гипотезы простого электростатического притяжения, так как эти мутации оказали минимальный эффект на способность связывания токсина. Кроме того, авторы этих работ показали, что мутация F385C не только уменьшает чувствительность к гуанидиновым токсинам, но и увеличивает чувствительность к Zn^{2+} и Cd^{2+}, таким образом придавая Na^+-каналам клеток мозга свойства Na^+-канала клеток сердца.

Вторая характеристика, которая отличает Na^+-каналы клеток сердца, мозга и скелетных мышц и практически неотделима от чувствительности для токсинов, — увеличение сенситивности TTX-R-каналов к блокированию двухвалентными катионами типа Cd^{2+} и Zn^{2+}. Катионы также конкурентно ингибируют связывание TTX и STX, что позволяет предположить, что они имеют общий участок связывания в Na^+-канале. Эти двухвалентные ионы хорошо взаимодействуют с цистеинами и гистидинами, предполагая, что цистеиновый остаток может считаться необходимым для TTX-S- или TTX-R-свойств связывания.

Как сообщалось, цистеин в положении 374 в изоформе канала клеток сердца может быть остатком, который объясняет эти различия в аффинности. После RH1(AC M27902)-мутации соответствующего остатка цистеина на тирозин (C374Y) чувствительность к TTX резко возрастала (в 730 раз), но в то же время чувствительность для двухвалентных ионов (Cd^{2+}) уменьшалась в 28 раз. Это означает, что RH1-мутантный канал показал чувствительность к TTX и катионному блоку, подобную каналам нервных клеток, и что видоизмененный остаток *цис* был определяющим для различий между изоформами каналов. Это также показывали эксперименты с мутациями соответствующих остатков в изоформе канала скелетной мышцы (Y401C), которые также уменьшили чувствительность к блокирующему действию TTX и увеличили чувствительность к блокирующему действию Cd^{2+}. Некоторые последующие эксперименты подтвердили эти результаты.

Изучение химер с каналами от скелетной мышцы крысы (TTX-S) и клонами изоформ каналов клеток сердца (TTX-R) под-

твердили предыдущие эксперименты с мутациями и показали, что чувствительность к TTX может быть изменена у двух изоформ путем замены тирозина-401 в μ1 и цистеина-374 в SkM2 соответственно. Можно сказать, что соответствующий остаток важен, но не является определяющим в различии в аффинности гуанидинового токсина у изоформ каналов клеток скелетной и сердечной мышц.

Конотоксины — биологически активные пептиды из яда улиток семейства *Conus*. Яд каждой *Conus* содержит удивительно разнообразные пептиды, которые имеют 10—30 аминокислот в цепи. Например, маленькие пептиды яда от *Conus geographus* имеют мишени в виде K^+-, Ca^{2+}- и Na^+-каналов, ацетилхолиновых рецепторов и НМДА-рецепторов. Маленький (длиной в 22 аминокислоты) пептид, обозначенный как μ-конотоксин GIII, действует на Na^+-каналы и вызывает их блок. μ-Конотоксин — молекула, очень интересная для ученых, работающих с Na^+-каналами. С тех пор как структура этого пептида была определена с очень высоким разрешением, пептид может использоваться как молекулярный зонд для исследований различных моделей структуры Na^+-каналов. На основе исследования влияния μ-конотоксина в экспериментах с мутациями было предложено, что положительно заряженная группа аргинина-13 непосредственно вовлечена в его связывание в Na^+-канале.

Установлены некоторые сходства между конотоксинами и гуанидиновыми токсинами TTX и STX. Они блокируют Na^+-каналы. Гуанидиновая группа требуется для связывания. Дальнейшие исследования показали конкурентоспособное ингибирование между STX и μ-конотоксином GIIIA и GIIIB и вероятность того, что участки связывания для TTX/STX и конотоксина перекрываются (частично совпадают). Существует также аналогия между эффектом этих токсинов на Na^+-каналы и различиями в чувствительности различных изоформ каналов. Изоформы каналов скелетной мышцы и электрического органа угря демонстрируют высокую аффинность к μ-конотоксину, тогда как изоформы каналов клеток мозга и сердца являются резистентными к его блокирующему действию.

Несмотря на эти сходства и в противоположность результатам, полученным в экспериментах с мутациями в пределах TTX/STX-связывающего домена, в котором замена отдельного глутамата может устранить TTX- и STX-чувствительность в изоформе канала клеток мозга крыс (αII), не было найдено никакого единичного аминокислотного остатка, который определял бы основное влияние или на ту или иную силу связывания или специфичность μ-конотоксина. Мутация E403Q в SkM1 крысы (соответствующая упомянутой E387 в αII) предотвращает блокирование тока, вызванное TTX и STX, но уменьшает сенситивность μ-конотоксина

только в 4 раза. Мутация Y401C уменьшает чувствительность к TTX у SkM1, несколько уменьшает эффект μ-конотоксина, однако сохраняет значительную чувствительность к нему. Мутация, которая приводит к наибольшему уменьшению аффинности к μ-конотоксину, была связана с заменой глутамата в положении 758 на глутамин (E758Q) в области внешнего устья. Эта мутация уменьшила аффинность связывания μ-конотоксина в 48 раз и в то же время вызвала уменьшение связывания TTX в 375 раз.

Приведенные данные поддержали гипотезу о перекрывании мест связывания μ-конотоксина и гуанидиновых токсинов, но все же не дали объяснения различиям в аффинности связывания μ-конотоксина у различных Na^+-каналов. В случаях, когда молекулярные клоны изоформ с разной аффинностью для лиганда доступны, могут быть применены преимущественно две стратегии: изучение химер и мутагенеза. Изучение химер, чувствительных к μ-конотоксину у SkM1 крыс и μ-конотоксинрезистентного SkM2 канала крыс, демонстрирует, что μ-конотоксин взаимодействует со всеми четырьмя доменами, очевидно, без доминирующего взаимодействия с любым из них. Однако недавние результаты показали, что DI и особенно DII играют более важную роль в формировании рецептора к μ-конотоксину, чем другие домены.

Стратегия мутаций была использована, чтобы разделить различные компоненты комплексного взаимодействия между рецептором и лигандом уже в случае TTX или STX. Попытки определения регионов связывания μ-конотоксина с помощью метода цистеинового мутагенеза закончились идентификацией семи остатков, формирующих стенку поры. В SkM1-каналах — это D400, Y401, W402, E758, W1239, D1241 и W1531, однако эти остатки не вносят одинакового вклада в связывание токсина. Заряженные остатки в положениях 758 и 1241 представляются наиболее важными.

Трудность в уточнении участка связывания μ-конотоксина определена тем, что молекула этого токсина имеет значительно бóльшие размеры, чем TTX или STX, и поэтому взаимодействует со связывающим участком более сложным образом.

Конопептиды интересны вследствие их высокой селективности, благодаря которой могут быть основой потенциальных лекарственных препаратов. С открытием TTX-R-типа канала нейронов и конопептидов, которые могут различать среди TTX-S-подтипов Na^+-каналы, появились дополнительные возможности для их терапевтического применения.

8.8.3. Место связывания 2

Многие нейротоксины модифицируют воротный механизм Na^+-каналов, долгое время поддерживая каналы в открытом состоя-

нии. В противоположность молекулам TTX или STX, которые могут действовать на Na^+-канал только с внешней стороны, представители группы липидорастворимых соединений могут получить доступ к определенному месту связывания Na^+-канала, находящегося в плазматической мембране. Эта группа соединений включает алкалоиды подобно BTX, аконитину, вератридину и GTX. Они связываются с местом связывания 2 у Na^+-каналов (см. рис. 8.2, *в*, табл. 8.2). Все эти токсины существуют в природе: BTX секретируется кожей колумбийской ядовитой лягушки рода *Phyllobates*, а другие три токсина имеют растительное происхождение. Вератридин изолирован из алкалоидной смеси чемерицы — растения семейства *Liliaceae*. Аконитин — алкалоид, вырабатываемый растением *Aconitum napellus*. Граянотоксин найден в рододендронах и других растениях семейства вересковых.

Данные соединения проявляют свое нейротоксическое действие на Na^+-каналы мембран нервов и мышц, которое заключается в их постоянной активации. Повышенная возбудимость Na^+-каналов объясняется двумя эффектами:

1) смещением активационной кривой Na^+-каналов в сторону более отрицательных величин потенциала;

2) блоком быстрой инактивации этих каналов.

Поскольку эти молекулы заставляют Na^+-каналы открываться более легко и оставаться открытыми дольше, чем в нормальных условиях, их можно назвать агонистами, или активаторами Na^+-каналов.

Прежде всего рассмотрим феноменологическую сторону нейротоксического действия BTX, вератридина, аконитина и GTX на мембраны клеток в виде первых, наиболее простых экспериментов, выполненных с использованием этих соединений.

Батрахотоксин может рассматриваться как полный агонист, так как при воздействии он вызывает одновременное изменение всех основных свойств Na^+-каналов. Кроме двух выше упомянутых эффектов BTX ухудшает проводимость одиночных каналов и их селективность для ионов.

На рис. 8.16, *а* показано развитие во времени Na^+-токов, текущих через Na^+-каналы в клетках гибридной линии нейробластома-глиома, перфузируемых стандартным раствором, а на рис. 8.16, *б* продемонстрированы Na^+-токи, текущие через Na^+-каналы в условиях перфузии клетки раствором, содержащим BTX в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М. Отсутствует фаза инактивации тока.

На рис. 8.17 показано смещение влево примерно на 50 мВ активационной кривой под действием BTX в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М. Это смещение было меньше в клетках миокарда новорожденных крысят (приблизительно на 30 мВ).

На рис. 8.18 продемонстрирована запись ионных токов, возникающих на фоне разных по величине тестовых ступенек в пере-

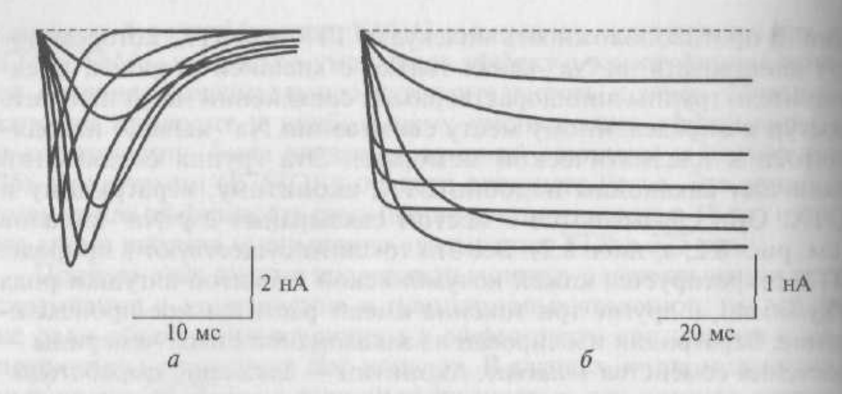


Рис. 8.16. Влияние ВТХ на Na^+-токи у клеток нейробластомы (при экспериментах использовалась гибридная линяя нейробластома-глиома NG 108-15):

а — Na^+-токи, текущие через Na^+-каналы в клетках нейробластомы, перфузируемых стандартным раствором. Поддерживаемый потенциал составляет –100 мВ; тестируемые ступеньки деполяризации от –100 до –45, –40, –35, –20, +15 мВ; *б* — Na^+-токи, текущие через Na^+-каналы в клетках нейробластомы, перфузируемых стандартным раствором, содержащим ВТХ в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М через 30 мин после начала перфузии. Поддерживаемый потенциал составляет –110 мВ; тестируемые ступеньки деполяризации от –110 до –90, –85, –75, –65, –40, –35, –25 мВ

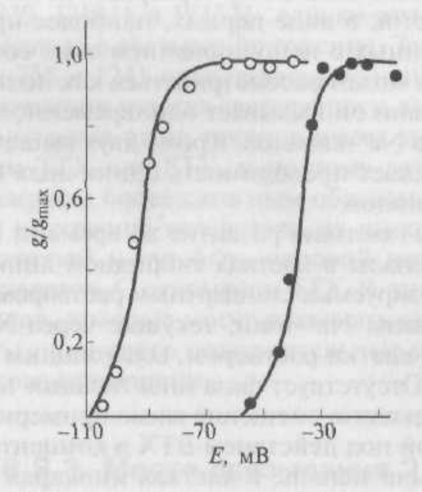


Рис. 8.17. Влияние ВТХ в концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М на активационную кривую клеток нейробластомы:

черные кружки — контроль; белые кружки — влияние соединения через 30 мин

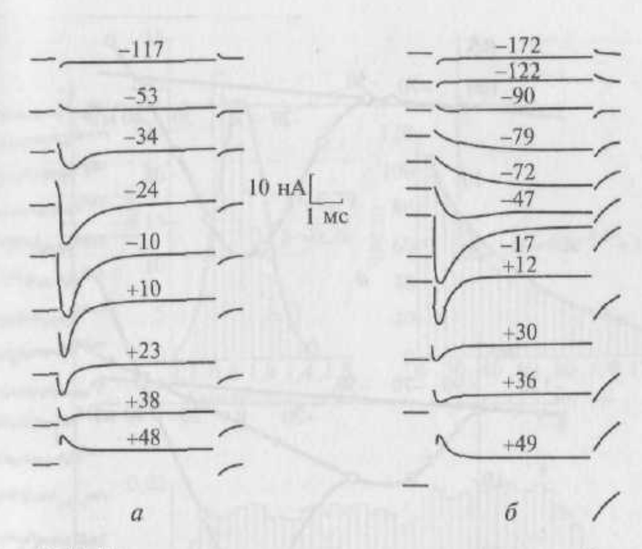


Рис. 8.18. Ионные токи, возникающие в перехвате Ранвье:

а — в стандартном перфузионном растворе (поддерживаемый потенциал составляет −90 мВ); *б* — в растворе, содержащем $2 \cdot 10^{-5}$ M BTX (поддерживаемый потенциал составляет −97 мВ); величина тестовой ступеньки смещения потенциала относительно поддерживаемого показана над каждой кривой тока, зарегистрированного на уровне этого потенциала

хвате Ранвье, находящемся в стандартном перфузионном растворе (рис. 8.18, *а*) и в растворе, содержащем BTX (рис. 8.18, *б*). Уже простой визуальный просмотр этих записей выявляет, что модифицированные BTX Na^+-каналы активировались при более отрицательных потенциалах. Батрахотоксин устранял нормальную инактивацию Na^+-каналов, что приводило к появлению стационарного входящего Na^+-тока, деполяризующего мембрану в отсутствие фиксации потенциала. Интересно, что BTX не сразу модифицирует все каналы, а делает это с течением времени, поэтому часть каналов в начале эксперимента обладают интактными свойствами.

На рис. 8.19 представлены вольт-амперные характеристики перехвата Ранвье, причем в первом случае перехват Ранвье находился в стандартном перфузионном растворе (рис. 8.19, *а*), а во втором — в растворе, содержащем BTX (рис. 8.19, *б*). Кривая на рис. 8.19, *а* построена по пиковым значениям интактного Na^+-тока, показанного на рис. 8.18, *а*. Кривая на рис. 8.19, *б* представляет собой вольт-амперную кривую для модифицированных (треугольники) и интактных (кружки) каналов.

На рис. 8.20 показано влияние BTX на Na^+-канал нейробластомы. Регистрация Na^+-тока через одиночный Na^+-канал была проведена методом patch-clamp в конфигурации outside-out patch и

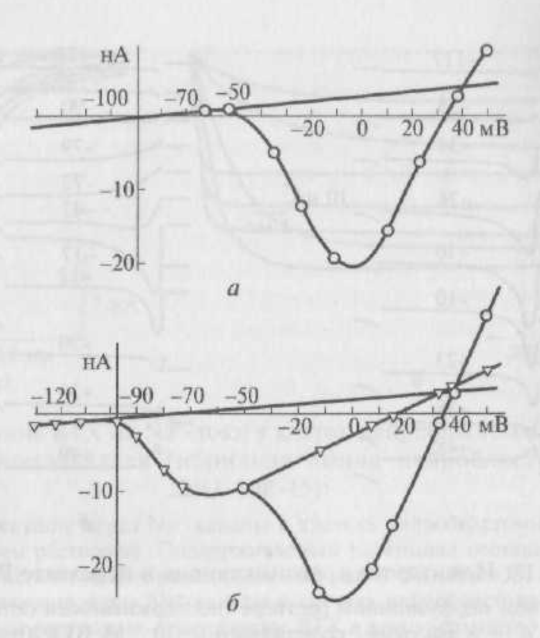


Рис. 8.19. Вольт-амперные характеристики, построенные на основании экспериментов, приведенных на рис. 9.18:

а — вольт-амперные характеристики, полученные для перехвата Ранвье, находящегося в стандартном перфузионном растворе; *б* — вольт-амперные характеристики, полученные для перехвата Ранвье, находящегося в стандартном перфузионном растворе, содержащем $2 \cdot 10^{-5}$ М ВТХ; в обоих случаях кривые построены по пиковым (кружки) и стационарным (треугольники) значениям мембранных токов, показанных на рис. 8.18. Изменение тока утечки показано прямой линией

представлена для интактного канала на рис. 8.20, *а*. Гистограмма распределения амплитуд каналов интактной клетки показана на рис. 8.20, *б*, а гистограмма распределения времени жизни открытого состояния канала — на рис. 8.20, *в*. Все параметры соответствуют нормальной активности Na^+-канала нейробластомы. Вследствие развития типичного процесса инактивации гистограмма распределения времен жизни открытого состояния экспоненциально уменьшается, однако добавление в patch-пипетку ВТХ кардинально меняет этот процесс (рис. 8.20, *г*) за счет модификации Na^+-каналов.

Итак, ВТХ устраняет быструю и медленную Na^+-инактивацию и повышает чувствительность активационных ворот к деполяризации. Постоянная активация Na^+-каналов на фоне потенциала покоя мембраны объясняется смещением кривой зависимости потенциала активации Na^+-каналов в сторону более отрицательных значений и блоком быстрой инактивации этих каналов. Число модифицированных ВТХ Na^+-каналов возрастает с течением вре-

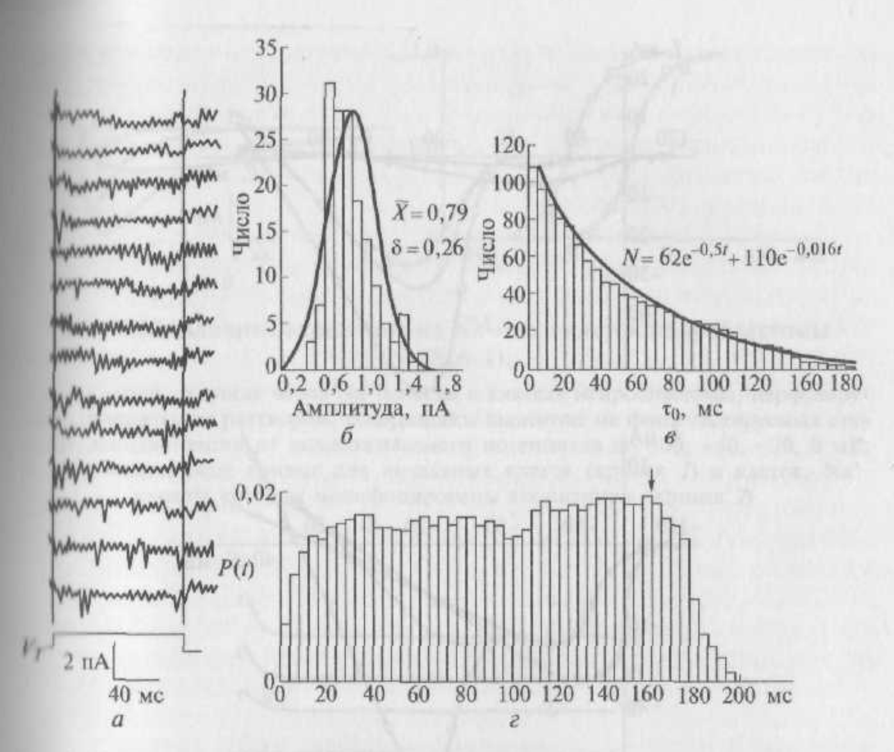


Рис. 8.20. Влияние BTX на Na^+-канал нейробластомы и его основной анализ:

а — регистрация Na^+-тока через одиночный Na^+-канал в конфигурации outside-out patch. Поддерживаемый потенциал составляет −90 мВ. Показано 14 зарегистрированных фрагментов канального тока на фоне ступенчатой деполяризации до −54 мВ с интервалом 5 с; б — распределение амплитуд; в — распределение длительности открытого состояния канала; г — гистограмма распределения времен жизни открытого состояния канала (распределение времен жизни в открытом состоянии) при добавлении BTX в patch-пипетку в концентрации 10 мкмоль/л

мени воздействия, что увеличивает стационарный Na^+-ток при потенциале покоя (рис. 8.21). Именно поэтому вне фиксации потенциала мембрана деполяризуется. На рис. 8.21 показано изменение вольт-амперной характеристики перехвата Ранвье под действием BTX. Из рисунка следует, что модификация Na^+-каналов прогрессирует во времени. Под действием токсина исходная вольт-амперная кривая уменьшается, а кривая, характеризующая модифицированные каналы, — увеличивается.

Алкалоид растительного происхождения — аконитин известен очень давно. Обычно он вызывает деполяризацию мембран нервных и мышечных клеток. В сердечной мышце эта деполяризация может приводить к фибрилляции. На рис. 8.22 показано влияние

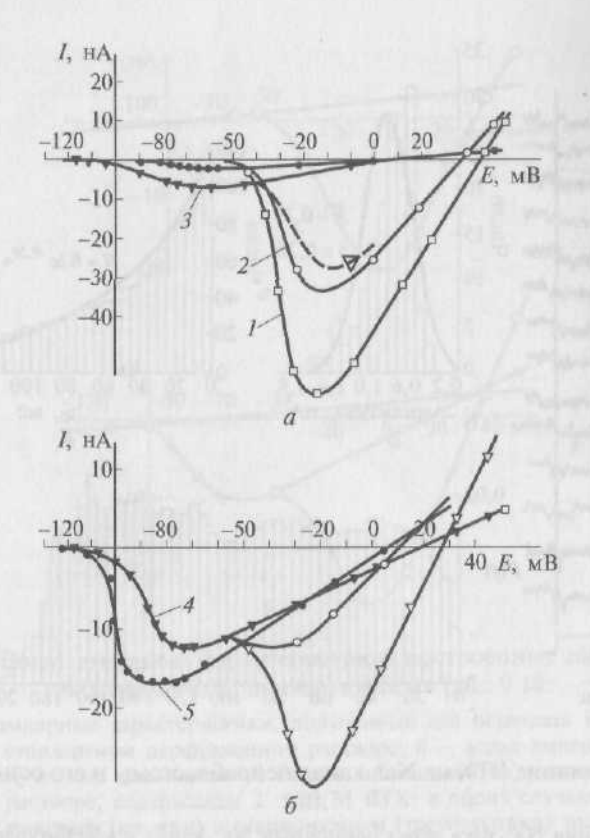


Рис. 8.21. Изменение вольт-амперной характеристики перехвата Ранвье под действием $2 \cdot 10^{-5}$ М ВТХ (во избежание перегрузки множеством кривых рисунок разделен на две панели):

а — верхняя панель; *б* — нижняя панель; *1* — вольт-амперная характеристика в стандартном перфузионном растворе, не содержащем токсин; *2—5* — вольт-амперные характеристики в стандартном перфузионном растворе, содержащем токсин, через 5, 10, 20, 35 мин регистрации соответственно; заполненными символами обозначены стационарные, а пустыми символами — пиковые значения тока

аконитина на Na^+-токи клеток нейробластомы, текущие через Na^+-каналы. Клетки нейробластомы перфузировали стандартным раствором, содержащим аконитин на фоне тестируемых ступенек деполяризации, что показано на рис. 8.22, *а*, а активационные кривые для интактных клеток (правая кривая) и клеток, Na^+-каналы которых модифицированы аконитином (левая кривая), продемонстрированы на рис. 8.22, *б*.

На рис. 8.23, *а* показаны модифицированные аконитином токи через Na^+-каналы перехвата Ранвье и активационные и инактивационные кривые для интактных (пустые символы) и модифици-

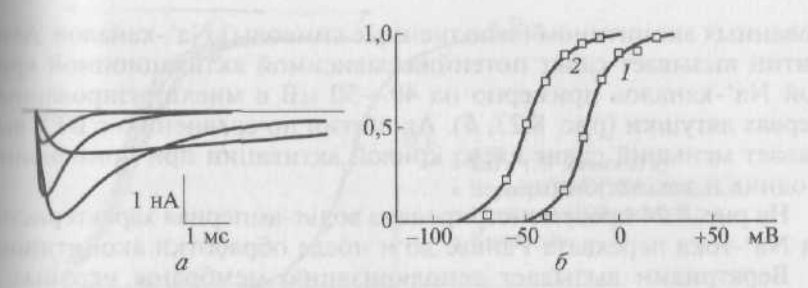


Рис. 8.22. Влияние аконитина на Na^+-токи клеток нейробластомы (N-18 A-1):

а — Na^+-токи, текущие через Na^+-каналы в клетках нейробластомы, перфузируемых стандартным раствором, содержащим аконитин на фоне тестируемых ступенек деполяризации от поддерживаемого потенциала до –60, –40, –20, 0 мВ; *б* — активационные кривые для интактных клеток (кривая *1*) и клеток, Na^+-каналы которых модифицированы аконитином (кривая *2*)

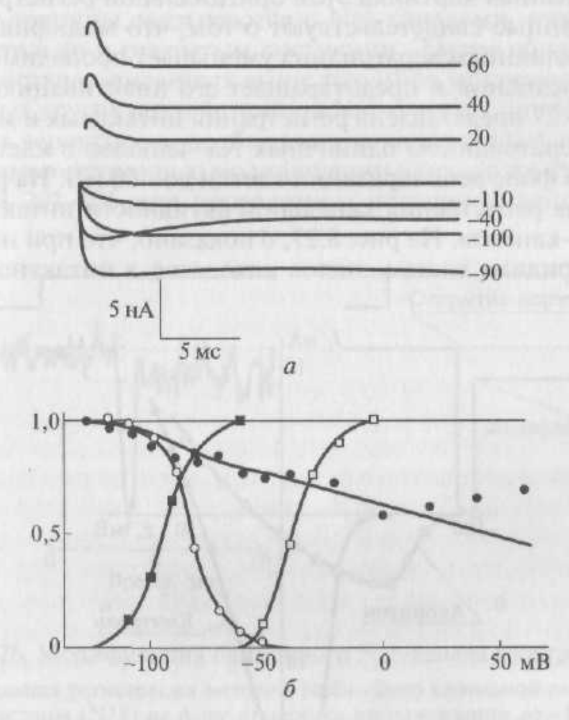


Рис. 8.23. Модификация аконитином Na^+-каналов:

а — модифицированные аконитином токи через Na^+-каналы перехвата Ранвье, возникающие на фоне тестируемых ступенек; *б* — активационные и инактивационные кривые для интактных (пустые символы) и модифицированных аконитином (заполненные символы) Na^+-каналов

рованных аконитином (заполненные символы) Na^+-каналов. Аконитин вызывает сдвиг потенциалзависимой активационной кривой Na^+-каналов примерно на 40—50 мВ в миелинизированных нервах лягушки (рис. 8.23, *б*). Аконитин по сравнению с ВТХ вызывает меньший сдвиг влево кривой активации при применении у одних и тех же клеток.

На рис. 8.24 продемонстрирована вольт-амперная характеристика Na^+-тока перехвата Ранвье до и после обработки аконитином.

Вератридин вызывает деполяризацию мембраны нервных и мышечных клеток за счет стойкого повышения Na^+-проводимости, однако эта деполяризация развивается медленно. Вещество вызывает сдвиг потенциалзависимой активационной кривой Na^+-тока влево. Аналогичное действие оказывают и другие аналоги вератридина (рис. 8.25).

Рассмотрим модификацию активности одиночных Na^+-каналов под влиянием вератридина. На рис. 8.26, *а* показана оригинальная регистрация одиночного Na^+-канала, а на рис. 8.26, *б* — идеализированная картинка этой оригинальной регистрации. Полученные данные свидетельствуют о том, что модификация Na^+-канала под влиянием вератридина уменьшает проводимость канала до 15 % исходной и предотвращает его инактивацию.

На рис. 8.27 представлена регистрация интактных и модифицированных вератридином одиночных Na^+-каналов в клетке нейробластомы на фоне деполяризации клетки до –60 мВ. На рис. 8.27, *а* представлена регистрация канальной активности интактных одиночных Na^+-каналов. На рис. 8.27, *б* показано, что при начале действия вератридина часть каналов находятся в интактном состоя-

Рис. 8.24. Вольт-амперная характеристика Na^+-тока перехвата Ранвье до и после обработки аконитином (концентрация 150 ммоль/л)

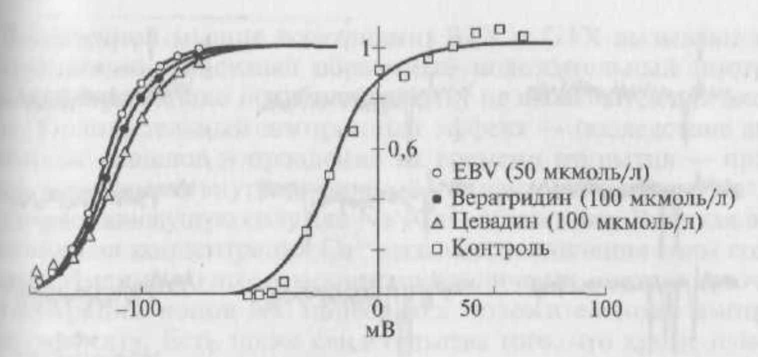


Рис. 8.25. Сдвиг потенциалзависимой активационной кривой Na^+-тока в сторону отрицательных величин под влиянием вератридина и его аналогов

нии, а часть — уже в модифицированном. На рис. 8.27, *в* показано, что все каналы модифицированы вератридином.

Все эти токсины связываются с Na^+-каналами, находящимися предпочтительно в открытым состоянии. Таким образом, связывание и действие описанных выше токсинов усиливаются посредством любых других воздействий на Na^+-каналы, при которых увеличивается вероятность пребывания каналов в открытом состоянии, например с помощью модификации каналов токсинами скорпиона DPI 201-106 или посредством повторной деполяризации.

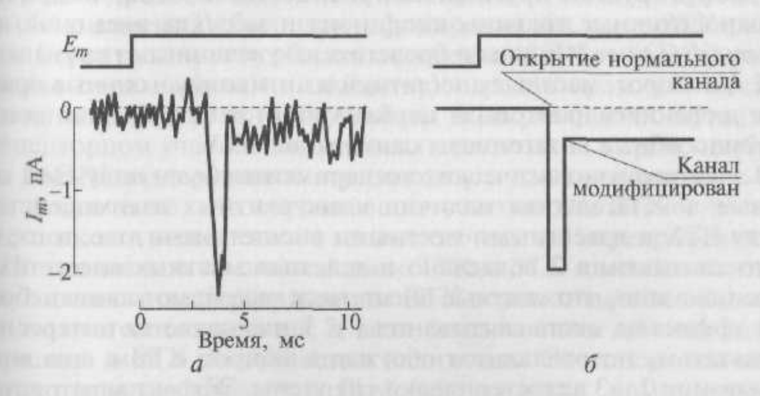


Рис. 8.26. Модификация одиночного Na^+-канала вератридином:

а — оригинальная регистрация методом patch-clamp канальной активности клеток нейробластомы (N18) на фоне ступеньки деполяризации до −60 мВ от уровня мембранного потенциала. Вератридин в концентрации 0,25 мкмоль/л находится в patch-пипетке. После 3,5 мс одиночный Na^+-канал открывается с нормальной проводимостью. Через 0,8 мс Na^+-канал модифицируется вератридином. Эта модификация уменьшает проводимость канала на 15 % и предотвращает инактивацию; *б* — идеализированная картинка оригинальной регистрации

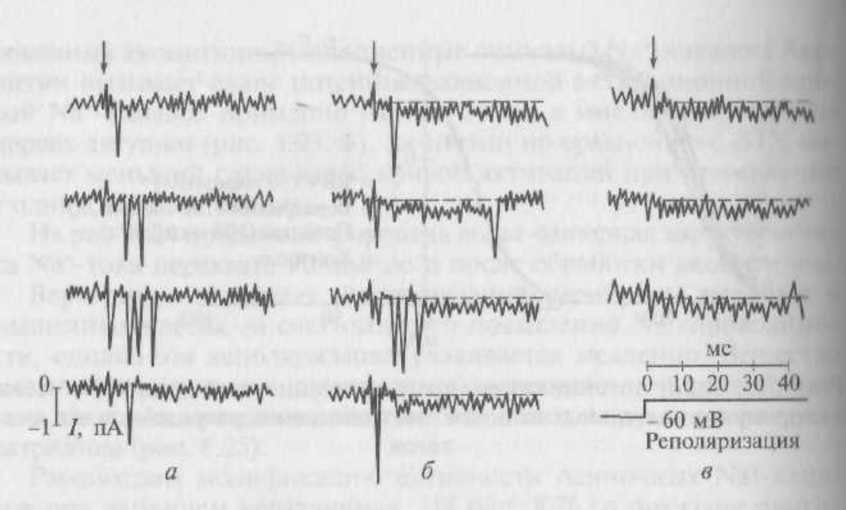


Рис. 8.27. Регистрация интактных и модифицированных вератридином одиночных Na^+-каналов в клетке нейробластомы на фоне деполяризации клетки до –60 мВ:

а — регистрация канальной активности интактного одиночного Na^+-канала; *б* — при начале действия вератридина часть каналов находится в интактном состоянии, а часть — в модифицированном; *в* — все каналы модифицированы вератридином; стрелка показывает начало тестирующего импульса

Особенно связывание ВТХ с местом связывания 2 аллостерически модулируется другими нейротоксинами. Так, например, α-полипептидные токсины скорпиона и морских анемонов, пиретроидные инсектициды и бреветоксин увеличивают связывание ВТХ. Наоборот, местные анестетики и антиконвульсивные препараты дифенилгидрантоин и карбамазепин действуют как конкурентоспособные антагонисты связывания ВТХ.

В электрофизиологических экспериментах были получены косвенные доказательства наличия конкурентных взаимодействий между ВТХ и известными местными анестетиками, т. е. того, что место связывания 2 вовлечено в действие местных анестетиков. Было показано, что местные анестетики оказывают лишь небольшой эффект на места связывания 1 и 3, что является интересным результатом, позволяющим обсуждать вопрос о том, что места связывания 2 и 3 аллостерически сцеплены. Эффект вератридина, аконитина и ВТХ является зависимым как от концентрации, так и от частоты и ингибируется ТТХ. Эти факты и данные о том, что само связывание меченого ВТХ ингибируется при помощи ТТХ, подразумевают функциональное сцепление мест связывания 1 и 2. Однако этот результат находится в частичном противоречии с данными о том, что ВТХ не влияет на связывание лигандов с местом связывания 1.

В сердечной мышце вератридин, BTX и GTX вызывают концентрационно-зависимый обратимый положительный инотропный эффект. Однако подобный эффект не выявляется для аконитина. Положительный инотропный эффект — последствие активации Na^+-каналов и продления их времени открытия — приводит к увеличению внутриклеточной концентрации ионов Na^+, что уменьшает движущую силу для Na^+/Ca^{2+}-обменника. Высокая внутриклеточная концентрация Ca^{2+} вызывает увеличение силы сокращения. Именно по этому механизму увеличение внутриклеточной концентрации ионов Na^+ приводит к положительному инотропному эффекту. Есть также свидетельства того, что кроме изменения воротной кинетики BTX увеличивает относительную проводимость Na^+-каналов для больших ионов, включая ионы Ca^{2+}. Этот прямой эффект может вносить вклад в положительный инотропный эффект BTX.

Относительно недавно было сделано несколько попыток охарактеризовать участок связывания для этих токсинов. Была проведена идентификация с помощью фотоаффинного маркирования и картографии пептида антителами, специфическими к последовательности трансмембранного сегмента S6DI как важного элемента BTX-рецепторного участка. Эти данные были поддержаны результатами экспериментов с точечной мутацией в этом регионе, которые показали, что замена единичного остатка приводит к образованию BTX-нечувствительного канала. Критичным остатком в S6DI был аспарагин-434, который в дополнение к этому играет основную роль в процессе медленной инактивации. Позднее другой сегмент S6 в домене IV был идентифицирован как часть BTX-рецептора. Вероятно, вместе оба этих сегмента (S6DI и S6DIV) расположены смежно (или по соседству) с рецептором для местных анестетиков. Кроме того, результаты экспериментов с мутациями в рецепторном участке для местных анестетиков в трансмембранном S6DIV поддерживают эту гипотезу и дают возможность сделать заключение, что связывающие участки для BTX и местных анестетиков в этом регионе не идентичны, но перекрываются.

По сравнению со связыванием TTX и STX с местом связывания 1 связывание вератридина и BTX осуществляется с одним и тем же местом связывания 2, хотя связывающие домены для вератридина и BTX не полностью идентичны. Это также подтверждается данными о том, что *Phyllobates* лягушки, которые продуцируют BTX, имеют BTX-устойчивые Na^+-каналы, но эти каналы чувствительны к вератридину.

Еще один подход в исследовании связывающих свойств вератридина возник на основании результатов экспериментов, показывающих, что этот токсин влияет на ворота Na^+-каналов, замедляя их инактивацию. Как было упомянуто, процесс инактивации опосредован инактивационными воротами, сформированными

внутриклеточной петлей, соединяющей домены III и IV. IFM-последовательность присутствует в инактивационных воротах и необходима для процесса инактивации. Пептид, содержащий IFM-последовательность и два положительных заряда (в форме KIFMK-пептида), достаточен, чтобы сыграть роль инактивационных ворот, и эта структура может вызвать блок открытого канала. Исследование влияния этого пептида на связывание вератридина показало, что пептид и вератридин конкурируют за связывание в канале. Это не обязательно означает, что вератридин разделяет общий рецептор с KIFMK (пептидом), хотя эта возможность и предполагается.

8.8.4. Место связывания 3

Место связывания 3 — это участок взаимодействия для полипептида α-токсина скорпиона и токсинов морских анемонов (ATX), которые были выделены приблизительно 25 лет назад. Сначала они были известны как сердечные стимуляторы и нейротоксины. Механизм их действия — связывание с Na^+-каналами возбудимых тканей и селективное ингибирование их инактивации преимущественно за счет ингибирования переходов канала от открытого состояния в инактивированное.

Фармакологические свойства токсинов морских анемон (или актиний) хорошо изучены. Это полипептиды молекулярной массой от 3 до 300 кДа, изолированные из щупальца морской анемоны. Токсины, изолированные от родов *Anthopleura* (anthopleurin: Ap-A или Ap-B) и *Anemonia* (ATX I, II или V), являются относительно большими белками, классифицируемыми как токсины типа I морского анемона. Для проявления их действия на Na^+-каналы они должны быть апплицированы с внеклеточной стороны. Как обсуждалось, согласно современным представлениям о структуре Na^+-каналов домены, которые, как известно, связаны с инактивацией, в основном расположены внутриклеточно. Тот факт, что токсины морского анемона модифицируют инактивацию, хотя действуют с внеклеточной стороны, делает их интересными для использования в качестве зондов в исследованиях Na^+-каналов.

На рис. 8.28 продемонстрирован потенциал действия перехвата Ранвье миелинизированного нерва лягушки в стандартном перфузионном растворе (рис. 8.28, *а*) и после применения яда скорпиона (*Leiurus quinquestriatus*) в концентрации 1 мкг/мл (рис. 8.28, *б*).

На рис. 8.29 показан Na^+-ток перехвата Ранвье до и после применения яда скорпиона (*Leiurus quinquestriatus*). Наблюдается резкое замедление натриевой инактивации.

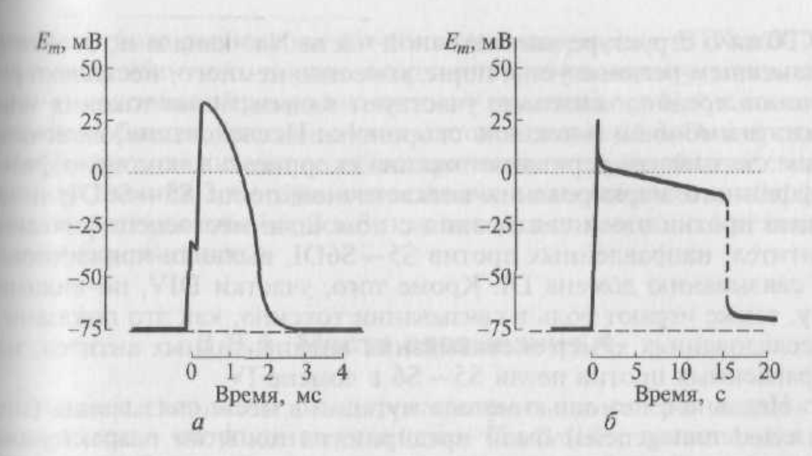


Рис. 8.28. Влияние яда скорпиона (*Leiurus quinquestriatus*) на потенциал действия перехвата Ранвье:

а — контроль: потенциал действия перехвата Ранвье миелинизированного нерва лягушки в стандартном перфузионном растворе; *б* — потенциал действия через 5 мин после применения 1 мкг/мл токсина; потенциал действия вызван деполяризационным током длительностью 100 мкс

α-Токсины скорпиона вырабатываются североафриканскими скорпионами, относящимися к семействам *Androctonus*, *Buthus* и *Leiurus*. α-Токсин V скорпиона, изолированный из яда *Leiurus quinquestriatus* (LqTx), связывает нейротоксиновый рецепторный участок — место связывания 3 у Na^+-канала. Это связывание сильно зависит от потенциала и замедляет или блокирует инактивацию Na^+-канала. α-Токсины скорпиона также аллостерически усиливают постоянную активацию теми нейротоксинами, которые связываются с местом 2, как, например, BTX. Структура нескольких токсинов из яда соответствующего скорпиона была определена методом ядерного магнитного резонанса.

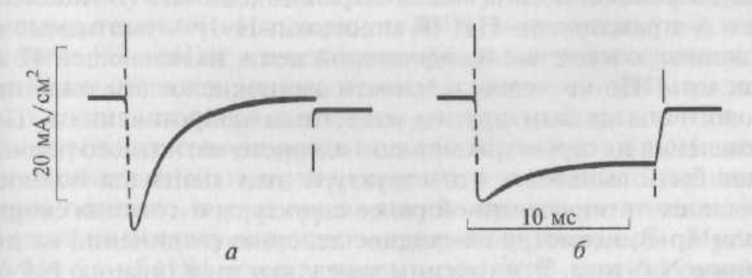


Рис. 8.29. Влияние яда скорпиона (*Leiurus quinquestriatus*) на Na^+-ток перехвата Ранвье:

а — до воздействия; *б* — после воздействия

Хотя о структуре внеклеточной части Na^+-канала и, особенно о внешнем регионе устья поры, известно немного, несколько регионов предположительно участвуют в связывании токсина морских анемонов и α-токсина скорпиона. Исследования, включающие связывание дериватов токсина скорпиона с помощью фотоаффинного маркирования внеклеточной петли S5—S6DI, и защита против этого связывания с помощью местоспецифических антител, направленных против S5—S6DI, выявили причастность к связыванию домена DI. Кроме того, участки DIV, по-видимому, также играют роль в связывании токсина, как это показано в исследованиях химер и связывания антипептидных антител, направленных против петли S5—S6 в домене IV.

Недавно с помощью метода мутаций в месте связывания (site-directed mutagenesis) были предприняты попытки охарактеризовать остатки, которые составляют место связывания 3. Было показано, что мутация глутаминовой кислоты 1613 из трансмембранного сегмента S3DIV Na^+-канала клеток мозга крысы уменьшает связывание токсина морского анемона ATX-II в 80 раз. Эта мутация не оказывала никакого эффекта на связывание STX. Кроме E1613 семь дополнительных остатков короткой внеклеточной петли, соединяющей сегменты S3 и S4 домена IV (S3—S4DIV), оказывали значительное действие на связывание ATX-II и α-токсина скорпиона. Эти экспериментально выделенные E1613 и S3—S4DIV представляют собой необходимые структуры для связывания соответствующих токсинов. Согласно модели эти части канала также вовлечены в связь активации канала с быстрой инактивацией. Аналогичные мутационные эксперименты были также выполнены с канальной изоформой (RH1) клеток сердца крысы. Остаток D1612, соответствующий E1613 у Na^+-канала клеток мозга крысы, был идентифицирован как необходимый для взаимодействия с Ар-В-токсином.

Относительно новый класс токсинов, взаимодействующих с местом связывания 3, был изолирован из паутины австралийского паука семейства *Atracinae*. δ-Атракотоксин-Ar1 (δ-Atracotoxin-Ar1) и δ-атракотоксин-Hv1 (δ-atracotoxin-Hv1) — пептидные нейротоксины, состоящие из одиночной цепи, включающей 42 аминокислоты. По последовательности аминокислот эти токсины не гомологичны любым другим известным нейротоксинам. После определения их структуры методом ядерного магнитного резонанса может быть выявлено, что структура этих пептидов полностью отличается от определенной ранее структуры α-токсина скорпиона или Ар-В, несмотря на сходное действие соединений на инактивацию Na^+-тока. Эти токсины замедляют инактивацию Na^+-тока и смещают зависимость активации от потенциала подобно α-токсину скорпиона. Представления о том, что δ-атракотоксины связываются с местом связывания 3, были получены на основании

конкурентного равновесия с α-токсином скорпиона, BTX и STX. δ-Атракотоксин и α-токсин скорпиона, по-видимому, связываются с частично перекрывающимися участками у Na^+-канала в пределах области, описанной как место связывания 3. Они проявляют также положительное аллостерическое взаимодействие с местом связывания 3, которое сопоставимо с аллостерическим сцеплением мест связывания 2 и 3, как это уже показано для некоторых других токсинов.

8.8.5. Место связывания 4

Токсины скорпиона, изолированные из яда северо- и южноамериканских скорпионов семейства *Centuroides*, связываются с участком нейротоксинового рецептора 4 (см. табл. 8.2) и классифицируются как β-токсины скорпиона; α- и β-токсины скорпиона *не делят общий нейротоксиновый участок связывания*, поскольку связывание одного типа не мешает связыванию другого. Токсин скорпиона, обладающий высокой аффинностью к Na^+-каналам, был изолирован также из яда бразильского скорпиона *Tityus serrulatus* и был назван *Tityus* γ-токсин (TiTxγ). Трехмерная структура нескольких β-токсинов скорпиона была получена недавно методом ядерного магнитного резонанса.

В отличие от результатов с α-токсином скорпиона яд американских скорпионов не оказывает никакого эффекта на инактивацию, но смещает потенциалзависимость процесса активации в область более отрицательных мембранных потенциалов. В результате этого эффекта Na^+-токи генерируются при мембранных потенциалах столь низких, как −70 мВ, т. е. при величинах, при которых Na^+-каналы находятся обычно в состоянии покоя (закрыты).

Относительно недавно было высказано предположение, что фиксация ворот в открытом состоянии (voltage sensor trapping) представляет собой фундаментальный механизм действия этих полипептидных токсинов, что предполагает связывание β-токсина скорпиона с внеклеточным концом S4DII сегмента или с остатками в петле S3—S4DII в течение транслокации (перемещения) положительных зарядов региона сенсора напряжения (S4) при переходе от состояния покоя к открытому состоянию канала. С помощью связывания с внеклеточным концом сегмента S4DII токсин может стабилизировать и устанавливать его в outward (активированную) позицию, и увеличивая таким образом активацию канала в ответ на последующие деполяризующие импульсы. Мутация G845 N в S3—S4DII может устранить эффект β-токсина скорпиона на потенциалзависимость процесса активации, предотвращая связывание токсина с внеклеточным концом активированной конформации сегмента S4DII, потому что это представляет собой

«неблагоприятное» стерическое или полярное/неполярное взаимодействие.

В последние годы токсины скорпиона приобрели важное значение главным образом из-за того факта, что некоторые из них проявляют высокую селективность к Na^+-каналам насекомых, причем они неядовиты для теплокровных животных. Эти данные и тот факт, что названные токсины разлагаются микроорганизмами, делают их потенциальными биопестицидами будущего. Ранее описанные α- и β-токсины скорпиона главным образом активны и против насекомых, и против млекопитающих, в то время как возбуждающий и депрессивный токсины скорпиона проявляют абсолютную селективность для Na^+-каналов насекомых.

8.8.6. Место связывания 5

Бреветоксины (PbTx) и цигуатоксин (CTX) представляют собой липидорастворимые полиэфирные морские токсины. Бреветоксины продуцируют морские динофлагелляты *Ptychodiscus brevis* (отряд панцирные жгутоносцы), которые относятся к планктонной форме. Цигуатоксин продуцируют морские динофлагелляты *Gambierdiscus toxicus*, а отравление у людей происходит посредством употребления в пищу *ciguatoxic reef fish*. Все восемь токсинов (от PbTx-1 до PbTx-8) были изолированы и очищены у *Ptychodiscus brevis*. Оба токсина связываются с определенным участком на белке канальной α-субъединицы, известным как место связывания 5, и модифицируют активацию и процессы инактивации Na^+-каналов. Электрофизиологические эксперименты показали, что две группы морских токсинов деполяризуют возбудимые мембраны двумя способами: смещением активационной кривой Na^+-каналов в направлении более отрицательных потенциалов и посредством ингибирования нормальной инактивации.

Бреветоксины представляют собой сложные полиэфирные нейротоксины, содержащие так называемое кольцо A, которое является существенным для их действия. Один из бреветоксинов, активатор Na^+-каналов PbTx-3, действует посредством пролонгирования времени открытия, так же как увеличения частоты открытия канала Na^+-каналов клеток сердца. В дополнение PbTx-3 вызывает смещение кривой активации в сторону более отрицательных мембранных потенциалов. Как следствие открытие канала наблюдали даже на уровне потенциала покоя. Кроме того, ингибирование инактивации Na^+-канала при различных мембранных потенциалах выявлялось в кардиомиоцитах и узловатых нейронах крыс, но не в клетках нейробластомы.

Упомянутые эксперименты показывают, что PbTx-3 — модификатор ворот с уникальными свойствами. В противоположность

другим воротным модификаторам, которые связываются с местами связывания 2 или 3 и действуют прежде всего через стабилизацию уже открывшихся каналов или реактивацию инактивированных каналов. PbTx-3 стабилизируют последнее (с точки зрения кинетики) закрытое состояние канала перед его открытием (pre-open) так же, как целый ряд (с точки зрения кинетики) различных открытых состояний канала. Эксперименты с фиксацией потенциала показали несколько поразительных характеристик Na^+-каналов, модифицированных PbTx-2 или PbTx-3, включая активацию канала при мембранных потенциалах от –160 до –80 мВ с чрезвычайно медленной кинетикой и отсутствием быстрой инактивации. Рецепторный участок расположен на α-субъединице Na^+-канала. Во время связывания остов токсина находится около внеклеточной петли S5—S6 домена DIV. Аллостерческое взаимодействие вызывает улучшение связывания ВТХ и вератридина в присутствии бреветоксина. Однако не было показано никакого эффекта ВТХ на связывание бреветоксина, что можно объяснить тем фактом, что ВТХ связывается в открытом канале со значительно более высокой аффинностью, чем в закрытом канале. Не было выявлено никакого взаимодействия бреветоксина с токсинсвязывающими местами 1 или 3. И СТХ, и бреветоксин усиливают индуцированный пиретроидами вход ионов Na^+ в клетки нейробластомы, мышечные клетки крысы или синаптосомы.

Деполяризацию мембраны или возникновение спонтанных потенциалов действия в клетках нейробластомы или перехватах Ранвье лягушки, вызванных СТХ, можно было бы объяснить результатом открытия Na^+-каналов на уровне потенциала покоя и отсутствием инактивации открытых каналов. Увеличение возбудимости нейрона под действием СТХ-1 предположительно может быть следствием увеличения скорости перехода инактивированного состояния к состоянию покоя TTX-R Na^+-каналов в течение деполяризации. В отличие от других нейротоксинов типа вератридина, α-токсина скорпиона и бреветоксинов СТХ-1 не оказывал никакого действия на активационную или инактивационную кинетику TTX-чувствительных и TTX-нечувствительных токов Na^+-каналов.

Определенные аспекты нейродегенеративных болезней должны быть исследованы, так как установлено, что активация Na^+-каналов, вызванных этими морскими токсинами, ведет к модификации выброса медиатора.

8.8.7. Место связывания 6

Пиретроиды представляют собой аналоги природных нейротоксинов растительного происхождения — приретринов, находя-

щихся в растениях семейства *Chryzanthemum*. Пиретроидные инсектициды являются мощными возбуждающими нейротоксинами, которые прекращают нормальную функцию нервов действием на Na^+-каналы и вызывают гипервозбуждение и паралич у животных. Пиретроиды особенно интересны, потому что они проявляют высокую степень селективной токсичности между млекопитающими и беспозвоночными. Это происходит из-за нескольких особенностей пиретроидов, а именно — выраженной температурной зависимости, эффективной чувствительности Na^+-каналов позвоночного/млекопитающего или различной скорости ферментативной детоксикации.

Пиретроиды составляют большую группу нейротоксических инсектицидов, которые были первоначально созданы как синтетические аналоги естественных пиретринов. Биологические эффекты пиретроидов включают эффекты и на другие ионные каналы, например Ca^{2+}-каналы, Cl^--канал GABA и рецепторы, подобные никотиновому рецептору ацетилхолина, но главная мишень пиретроидов — Na^+-каналы.

Эффект пиретроидов и ДДТ на Na^+-каналы возбудимых мембран заключается в пролонгировании Na^+-тока.

В качестве примера рассмотрим влияние ДДТ. На рис. 8.30 показан Na^+-ток в гигантском аксоне омара до и после воздействия $3 \cdot 10^{-7}$ М ДДТ. Видно, что под влиянием ДДТ инактивация выраженно замедляется. При длительной деполяризации все Na^+-кана-

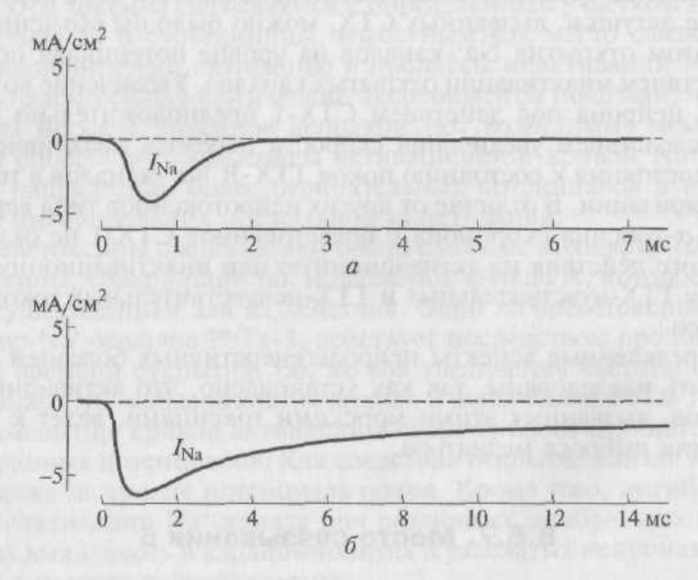


Рис. 8.30. Влияние ДДТ на Na^+-ток в гигантском аксоне омара: *а* — до воздействия; *б* — после воздействия в концентрации $3 \cdot 10^{-7}$ М

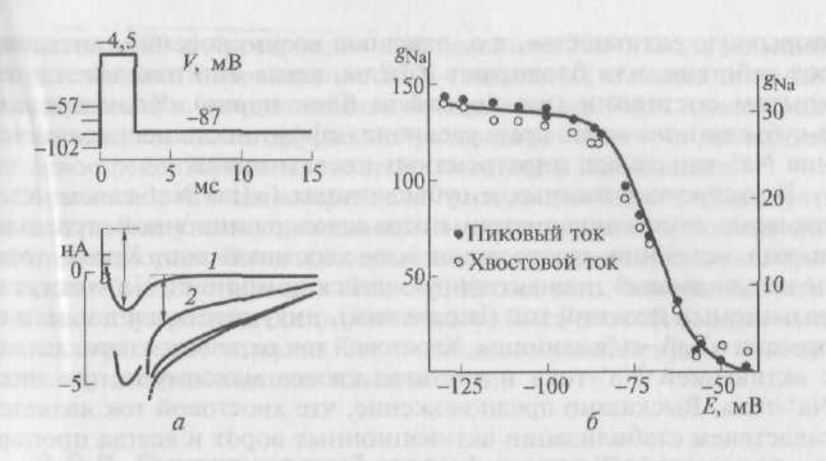


Рис. 8.31. Влияние ДДТ на Na^+-ток в перехвате Ранвье:

а — оригинальные кривые регистрации токов (нижняя панель), возникающих на фоне тестирующих сигналов (верхняя панель), поданных по указанной схеме; *1* — пиковый ток; *2* — хвостовой ток; *б* — инактивационная кривая, построенная по пику и хвостовому току, возникающему после окончания тестирующего импульса (концентрация ДДТ 140 мкмоль/л)

лы переходят в инактивированное состояние, поэтому при воздействии ДДТ *не наблюдается деполяризации мембраны.*

На рис. 8.31, *а* показаны оригинальные кривые регистрации Na^+-тока (нижняя панель), возникающие на фоне тестирующих сигналов (верхняя панель), поданных по известной программе, а на рис. 8.31, *б* представлена инактивационная кривая, построенная по пиковому и хвостовому току (tail current), возникающему после окончания тестирующего импульса. Вещество нарушает процесс *инактивации* Na^+-*каналов, однако между числом* активированных каналов во время пика Na^+-тока и каналами, сохраняющими состояние активации, что показывает хвостовой ток, имеется линейная зависимость. Именно поэтому инактивационные кривые для пикового и хвостового тока совпадают.

Таким образом, пиретроиды и ДДТ пролонгируют Na^+-ток у Na^+-каналов, который кончается развитием деполяризационного *постпотенциала. Эти эффекты ответственны за индукцию повтор*ной активности, которая является наиболее характерным эффектом пиретроидов, отравляющих нервную систему. Модификация пиретроидами ворот Na^+-каналов была изучена в экспериментах с фиксацией потенциала на лангусте, мембране аксона кальмара, миелиновом волокне нервов лягушки и клетках нейробластомы мыши. Электрофизиологическое изучение с использованием ооцитов *Xenopus laevis* с α-субъединицей (αIIa) *мозга показало,* что пиретроидовые инсектициды типа перметрина и циперметрина продлевают Na^+-токи, увеличивают их амплитуду и вызывают

«взрывную активность», т.е. пачечное возникновение потенциалов действия, или блокируют каналы, когда они находятся в открытом состоянии (use-dependent блок нерва). Коэкспрессия β-субъединицы мозга крыс увеличила аффинность места связывания Na^+-канала для пиретроидных инсектицидов.

В экспрессированных α-субъединицах (αIIa) Na^+-канала клеток мозга крысы циперметрин после деполяризационной ступеньки вызвал медленно «распадающийся» хвостовой ток. Кроме того, поддерживаемый неинактивирующийся компонент Na^+-тока, так называемый поздний ток (late current), индуцировался после экспрессии $\alpha IIa\beta_1$-субъединицы. Хвостовой ток развивался параллельно с активацией Na^+-тока и достигал своего максимума при пике Na^+-тока. Высказано предположение, что хвостовой ток является следствием стабилизации активационных ворот и всегда пропорционален числу Na^+-каналов, которые открыты в конце деполяризации. Напротив, индукция позднего тока подразумевает, что пиретроидные инсектициды взаимодействуют с закрытыми инактивационными воротами. Генерация хвостового тока была также описана в нейронах ганглиев задних корешков спинного мозга крысы, клетках нейробластомы мыши и гигантского аксона кальмара. Включение в состав α-цианогруппы (как у типа II пиретроидов) увеличивает эффект пиретроидов на хвостовой ток по сравнению с пиретроидами, лишенными α-цианогруппы (тип I пиретроидов, подобных тетраметрину). Кроме того, время экспозиции, мембранный потенциал и температура являются важными параметрами для вызванных пиретроидами хвостовых токов. Пиретроидный инсектицид тетраметрин оказывал более сильное влияние в модификации TTX-R-токов Na^+-каналов, чем у TTX-S Na^+-каналов. Несмотря на влияние пиретроидов на активацию и процессы инактивации Na^+-каналов, есть данные о том, что пиретроиды и ДДТ взаимодействуют предпочтительно с открытыми Na^+-каналами. Модификация Na^+-каналов повышается при деполяризации, что предполагает быструю и высокую аффинность связывания с активированным состоянием канала.

Как описано в подразделе о фосфорилировании Na^+-каналов, Na^+-канал клеток мозга фосфорилируется протеинкиназами во время деполяризации, однако точное значение фосфорилирования все еще до конца не понятно. Тем не менее показано, что пиретроиды, например 1R-делтаметрин и ДДТ, ингибируют фосфорилирование α-субъединицы.

Было описано аллостерическое взаимодействие между пиретроидами и несколькими токсинами типа алкалоидных активаторов (место связывания 2), α-токсинами скорпиона (место связывания 3), вератридинами (место связывания 2) и бреветоксином/конотоксином (место связывания 5). Например, есть аллостерическое сцепление среди рецепторных участков для BTX (место

связывания 2) и пиретроидов в выделенном Na^+-канале из мембран клеток мозга. Повышение BTX-связывания является потенциалзависимым и концентрационно-зависимым. Хотя аллостеричность модулировали другие нейротоксины, пиретроиды влияли на новое рецепторное место нейротоксина у Na^+-каналов.

Возможно, что аллостерическая модуляция может обеспечить новый подход увеличения селективной активности инсектицидов на мишени организмов одновременным применением аллостерически взаимодействующих веществ. Кроме того, возможные комбинации двух разных соединений могут быть способны увеличить деятельность инсектицида без очевидного увеличения в относящейся к млекопитающим токсичности.

8.8.8. Синтетический модификатор Na^+-каналов DPI 201-106

Многие встречающиеся природные соединения, подобные вератридину, аконитину, BTX, GTX и CTX, пролонгируют открытое состояние Na^+-каналов, главным образом активируя открытие каналов. Другие токсины, изолированные от африканских скорпионов (α-токсины скорпиона), или токсины морских анемон пролонгируют открытое состояние канала посредством ингибирования инактивации. Первым синтетическим соединением, которое пролонгирует открытие Na^+-каналов, было 4-[3-(4-дифенилметил-1-пиперазинил)-2-гидроксипропокси]-1Н-индол-2-карбонитрил (DPI 201-106). Оно, как было показано, вызывает цАМФ-независимый положительный инотропный ответ. Этот эффект может быть устранен высокоселективным блокатором Na^+-каналов — TTX, потому что положительный инотропный эффект DPI 201-106 непосредственно связан с увеличенным притоком ионов Na^+ через Na^+-каналы и DPI-модифицированные Na^+-каналы должны, как ожидается, быть ответственными за удлинение потенциала действия. Эти свойства DPI 201-106 могут быть также очень полезны в клинической практике для селективной модуляции Na^+-каналов.

Сопоставимое удлинение продолжительности потенциала действия может быть достигнуто после аппликации токсина ATX II. Однако важное различие, представленное в терминах селективности, для Na^+-каналов заключается в том, что ATX вызывает удлинение потенциала действия также посредством ингибирования выходящих K^+-токов, а не только путем активации Na^+-каналов. Другая положительная особенность этого соединения — его эффект вазодилатации, связанный с отрицательной хронотропностью, которая предполагает, что DPI 201-106 могло бы оказывать на Ca^{2+}-каналы антагонистический эффект. Эффект блокиро-

вания Ca^{2+}-каналов был впоследствии доказан двумя типами экспериментов: экспериментами с фиксацией потенциала при использовании изолированных кардиомиоцитов и изучением связывания радиолигандов. Тот же самый эффект был доказан для препаратов сосудов.

Дальнейшие исследования продемонстрировали, что DPI 201-106 увеличивает среднее время жизни открытого состояния Na^+-каналов, ингибируя их инактивацию и позволяя таким образом притоку ионов Na^+ продолжаться в течение потенциала действия у кардиомиоцитов крысы, морской свинки и в сердечной мышце человека.

Рассмотрим соединение пиперазилиндол DPI 201-106: S-DPI (DPI 205-430) имеет тенденцию действовать как агонист Na^+-каналов, тогда как R-DPI (205-429) действует как антагонист Na^+-каналов. Участок связывания для обоих оставался неизвестным. Хотя модификация Na^+-каналов при помощи DPI 201-106 может быть достигнута после обработки внешней стороны мембраны, препарат необязательно найдет мишень на внешней части Na^+-канала. Из-за своих липофильных свойств DPI 201-106 способен пройти через липидную фазу так, чтобы по аналогии с местными анестетиками молекула могла получить доступ к участку активации или вследствие проникновения через мембрану снаружи, или из цитоплазмы через внутреннее устье канала. Наиболее вероятно, что из-за своей гидрофобности DPI 201-106 взаимодействуют с гидрофобными карманами, т.е. доменами Na^+-канала, сформированными главным образом аполярными остатками типа аланина, валина, лейцина или изолейцина.

Хотя DPI 201-106 проявил многообещающие свойства как положительный инотропный агент in vivo, были сообщения как об аритмических, так и антиаритмические эффектах этого соединения. Самым явным антиаритмическим эффектом было продление интервала $Q—T$-электрокардиограммы, что может увеличить число больных torsade de points, типом злокачественной аритмии, которая является промежуточной между тахикардией и желудочковой фибрилляцией. Следующее перспективное соединение, вызывающее положительный инотропный эффект с менее выраженным антиаритмическим эффектом, был DPI типа 4-[3-(1-бензидрилазетидин-3-окси)-2-гидроксипропокси]-1H-индол-2-карбонитрил (BDF 9148). Другой аналог DPI 201-106 на основе пурина также был синтезирован и проявил себя намного более мощным.

Точный механизм продления потенциала действия остается неизвестным, так же как и то, какие структуры вовлечены в связывание DPI 201-106 с Na^+-каналами. Данные о том, что кардиомиоциты бычьего сердца являются абсолютно стойкими к DPI 201-106 и его пуриновым дериватам SDZ 211-939, могут помочь объяснять механизм их действия.

8.8.9. Место связывания местных анестетиков

Местные анастетики типа лидокаина и прокаина вызывают эффект, блокируя Na^+-каналы. Показано, что кроме Na^+-каналов они действуют на несколько типов ионных каналов из числа K^+- и Ca^{2+}-каналов или на рецепторы к нейротрансмиттерам. Все местные анестетики представляют собой относительно небольшие липидорастворимые молекулы обычно с группами амина, которые становятся положительно заряженными в кислой среде.

Информация о том, как работают местные анестетики, была получена на основании экспериментов с QX-314 — аналогом лидокаина, который всегда положительно заряжен и, следовательно, не растворим в липиде. Препарат QX-314B оказывает блокирующее действие на Na^+-каналы клеток сердца при аппликации как с наружной, так и внутренней стороны мембраны, но ингибирование Na^+-каналов клеток мозга происходит лишь тогда, когда препарат апплицирован с внутриклеточной стороны. Различие в действии постоянно заряженных местных анестетиков, подобных QX-314, показано для Na^+-каналов клеток сердца и мозга и для афферентных нейронов, расположенных в ганглиях задних корешков спинного мозга.

Изучение широкого спектра разнообразных клеток in vitro с использованием методов patch-clamp в конфигурации whole-cell или экспрессии α-субъединицы Na^+-каналов в ооциты *Xenopus laevis*, либо клетки млекопитающих выявило ингибирование Na^+-каналов, когда они находятся в открытом состоянии — use(-state)-dependent. Действие местных анастетиков увеличивалось, когда поддреживаемые потенциалы устанавливались в области большей деполяризации, тогда как при поддерживаемых потенциалах, лежащих в области большей гиперполяризации, блокирующее действие уменьшалось.

Сообщалось о многочисленных попытках охарактеризовать место связывания местных анестетиков. Несколько исследований показали наличие дозозависимого эффекта при связывании вератридина и BTX и местных анестетиков, что предполагает аллостерическое взаимодействие этих двух мест связывания. Вне места связывания 2 связывание местных анестетиков с местами связывания нейротоксинов на других участках рецептора не происходит. Например, местный анестетик PD85,639 не конкурирует за связывание с антиконвульсионными препаратами фенитоином и карбамазепином, связывающимися в Na^+-каналах из синаптосом и синаптических мембран.

Недавно опубликованные результаты показывают, что существует гидрофобное место связывания, которое отличается от места связывания 2, но аллостерически связанное с местом связывания 2. Несколько исследований показали предпочтительное вза-

имодействие соединений с Na^+-каналом, находящимся в инактивированном состоянии. В противоположность этим результатам недавно были опубликованы данные, по которым местный анестетик лидокаин не конкурирует с быстрой инактивацией. Эти эксперименты свидетельствуют, что блокирующий эффект местных анестетиков не является результатом процесса медленного восстановления от быстрой инактивации и не вовлекает увеличение быстро инактивирующихся каналов, как это описано в других работах. Эти данные представляют новую модель, которая фокусируется на процессах активации как более уместных для механизма действия местных анестетиков.

Для того чтобы более точно определить локализацию участка связывания для местных анестетиков, использовали направленные мутации (мутации непосредственно в потенциально возможных местах связывания). Наиболее явные изменения были достигнуты мутациями цитозольной стороны S6DIV. Мутации F1764A и Y1771A типа IIa (αII) из мозга крысы устраняли возможность блокирования канала местными анестетиками. В экспериментах, проводимых с медленно инактивирующейся изоформой III (αIII) из мозга крысы, которая в основном экспрессируется в течение эмбриогенеза, остатки фенилаланина-1710 и тирозина-1717 от S6DIV были определены как остатки, ответственные за связывание местных анестетиков.

Было высказано предположение, что эти остатки находятся на лицевой стороне по отношению к поре канала во время связывания с местными анестетиками. Это подразумевает то, что рецепторное место местного анестетика локализовано в самой поре канала. Согласно этой модели участок связывания местного анестетика может располагаться достаточно близко к селективному фильтру Na^+-каналов и к участку связывания инактивационных ворот. Кроме того, в результате мутации, меняющей треонин-1755 в сердце крысы на валин, как в изоформе IIa, был идентифицирован остаток, который управляет проходом QX-314 через пору на рецептор, ответственный за действие этого вещества, в случае, если QX-314 аппликируется экстрацеллюлярно.

Мутация аналогичной аминокислоты в типе IIa (I1760A) мозга крысы сформировала сердечный фенотип канала, приведя к его более высокой чувствительности к внешнему блоку посредством четвертичного деривата лидокаина. Кроме того, фенилаланин-1762 сердечной изоформы был идентифицирован как главный остаток для связывания QX-314 независимо от того, аппликируется ли он изнутри или экстрацеллюлярно. Все это поддерживает модель с отдельным участком связывания для QX-314. О подобных результатах сообщили и для скелетной мышцы, однако следует отметить, что направленные мутации аминокислот в других трех сегментах S6 в доменах I—III, которые могут взаимодействовать с

другими трансмембранными сегментами, до сих пор не были выполнены. В связи с тем что эти четыре домена канала, как считают, должны располагаться вокруг поры канала, вероятно, что другие сегменты S6 могут также внести вклад в формирование рецептора для местных анестетиков. Остатки в петлях поры, которые формируют селективный фильтр, — также хорошие кандидаты для будущих экспериментов, которые должны определить мишени местного обезболивающего действия.

8.9. Терапевтическое использование модуляторов Na^+-каналов

Na^+-каналы ответственны за инициирование и распространение потенциалов действия и в нервах, и в мышечных клетках. Их функциональные свойства определяются порогом возникновения потенциала действия и частотой генерации спайковой активности нейронов. Поэтому нейромодуляция функции Na^+-каналов, вероятно, существенно влияет на генерацию высокочастотных потенциалов действия, которые являются важным элементом эпилепсии. Na^+-каналы — потенциальные молекулярные мишени множества антиэпилептических препаратов. Несмотря на разнообразные химические структуры, их фармакологические свойства имеют несколько общих характеристик.

Антиэпилептики и нейропротективные препараты имеют различные мишени действия типа потенцирования GABA-эргических механизмов, блокады Na^+-, Ca^{2+}- и K^+-каналов и блокады глутамат/AMPA-рецепторов. Множество клинически важных антиэпилептических препаратов проявляют свое терапевтическое действие, преимущественно блокируя Na^+-каналы мозга в пределах терапевтических доз. Считается, что Na^+-каналы являются основной мишенью антиэпилептических препаратов, таких как фенитоин, карбамазепин и ламотригин. Кроме того, эти препараты могут быть предложены для лечения повреждений нейронов, вызванных ишемией и нейродегенеративными болезнями. Антиэпилептические препараты, такие как фенитоин и карбамазепин, эффективны при большом судорожном приступе и малых припадках без судорог; в терапевтических дозах они являются мощными блокаторами Na^+-каналов нейронов.

В мозге млекопитающих Na^+-каналы расположены в мембранах аксонов, мембранах тел клеток и дендритах нейронов. Каналы типа II (αII или в новой классификации $Na_V1.2$) преобладают в клетках коры, гиппокампа и мозжечка, тогда как в спинном мозге преобладают каналы типа I (αI или в новой классификации $Na_V1.1$), представленные более широко, чем каналы типа IIa. Каналы типа IIa (αIIa) найдены в большом количестве в аксонах и

дендритах, в то время как каналы типа I найдены в большем количестве в телах клеток и дендритах. Na^+-каналы типа I преобладают в позднем постнатальном пероде, тогда как каналы типа II экспрессируются во все стадии развития. Каналы типа III (αIII или $Na^+_V1.3$) встречаются в значительных количествах в незрелом мозге и экспрессируются в основном в эмбриональном и позднем постнатальном периодах. Каналы типа IV (αIV) широко представлены в коре, гиппокампе и стволе мозга (для получения более подробной информации в этой области мы рекомендуем обратиться к обзорным работам). Эксперименты in situ с гибридизацией мРНК показывают, что каналы типа IV выражены в нейронах, глии мозга и периферийных нервах. Приблизительно 80 % Na^+-каналов неокортекса относятся к типу IIa и 14 % — к типу I.

Антиэпилептические препараты, блокирующие Na^+-канал, эффективны у различных моделей животных, которые используются для идентификации и разработки новых антисудорожных препаратов. Показано, что блокаторы Na^+-каналов эффективны на фоне применения метода MES (исследование методом электрошока), который, как полагают, должен быть прогнозирующим для оценки эффективности антиконвульсанта против генерализованных тонических судорожных приступов. Кроме того, антиэпилептические препараты, которые ингибируют Na^+-ток через Na^+-каналы, эффективны в так называемой kindling-модели (в дословном переводе «разжигающая модель»). Kindling-модель имеет следующую историю. В конце 1970-х — начале 1980-х гг. была выдвинута гипотеза о существовании так называемого kindling-феномена. При постоянной стимуляции дофаминергических центров лимбической системы за счет действия психоактивных веществ, в том числе алкоголя, формируется и стабилизируется очаг патологической активности. Были проведены эксперименты со стимуляцией мозга крыс такой низкой интенсивности, которая не вызывает конвульсий. Однако через 2 недели при постоянной стимуляции у крыс начинались конвульсии. Такой же ответ на раздражение сохранялся в течение месяца. Наличие эпилептогенного поражения и локальная эпилептизация нейронов еще недостаточны для возникновения эпилепсии как болезни. Необходимо формирование эпилептического фокуса (очага).

Эпилептогенный очаг индуцирует формирование эпилептической системы по законам экспериментальной kindling-эпилепсии, вызывая изменения чувствительности нейронов и нейромедиаторных систем, снижая порог возбуждения прежде всего путем повышения синаптической проводимости и вызывая всю гамму нарушений, результатом чего является эпилептизация нейронов. Эта модель предсказывает клинический эффект локальных приступов, тогда как химически вызванные клонические приступы у грызунов (PTZ, стрихнином или возбуждающими аминокислотами) не

могут быть подавлены путем применения препаратов, которые блокируют Na^+-каналы. Помимо этого они эффективны при локальных и генерализованных тонико-клонических приступах у людей. Показано, что препараты ингибируют взрывную (пачечную) активность возникновения потенциалов действия при регистрации в условиях фиксации тока в культуре нейронов. Кроме того, ослабление ионных токов через Na^+-каналы возникает при применении в терапевтических концентрациях фенитоина, карбамазепина, ламотригина, топирамита, фелбамата и рилузола, о чем подробно будет сказано далее. Эффекты блокирования Na^+-каналов также наблюдают при действии антидепрессантов и нейролептиков.

Подобные фенитоину антисудорожные препараты уменьшают тяжесть приступов и повышают порог для разрядов в kindling-модели. Кроме того, антиэпилептики, подобные фенитоину, не оказывают или оказывают очень незначительное влияние на предотвращение генерализованных и миоклонических приступов у грызунов.

Есть доказательства о повышенной экспрессии Na^+-каналов в мембранах нейронов у определенных мутантных мышей (El-мыши), которые демонстрируют чувствительные к стимулу лимбические приступы. Kindled-приступы у грызунов и комплексные локальные приступы у человека, по-видимому, имеют общие характеристики, такие как изменения, способствующие возникновению приступов, включая изменения в ионных каналах и функциях возбуждающих и тормозных трансмиттерных систем.

Первые препараты поколения антиконвульсантов типа фенитоина, карбамазепина и вальпроата применялись для подавления ненормальной возбудимости нейронов, связанной с приступами, вызванными посредством комплексного потенциалзависимого и частотнозависимого угнетения ионных токов через Na^+-каналы. Эффекты были дозозависимыми. Карбамазепин и фенитоин действуют как конкурентоспособные ингибиторы активации Na^+-каналов посредством полных агонистов BTX и вератридина (место связывания 2), показывая, что оба препарата действуют как аллостерические ингибиторы активированных нейротоксином Na^+-каналов.

Препараты второго поколения типа ламотригина, топирамата, фелбамата и карбамазепина имеют те же самые механизмы действия. Эти антисудорожные препараты также проявляют эффекты на другие рецепторы, чем у Na^+-каналов, поэтому представляют собой неселективные блокаторы Na^+-каналов. Как сообщалось ранее, нейропротективный и антисудорожный препарат рилузол уменьшал входящий Na^+-ток (EC_{50} 51 мкмоль/л) в первичных культурах кортикальных нейронов крысы и в ооцитах, экспрессирующих α-субъединицу Na^+-каналов мозга. Важ-

но, что терапевтические концентрации упомянутых антиэпилептических препаратов в электрофизиологических экспериментах в конфигурации whole-cell действительно проявляли блокирующий эффект на Na^+-ток. Прямое подтверждение данных о блокирующих эффектах Na^+-каналов при применении фенитоинподобных антисудорожных препаратов было получено в экспериментах на срезах гиппокампа крысы in vitro. Низкие концентрации TTX оказывают антисудорожные эффекты, подобно фенитоину или карбамазепину.

Показано, что габапентин, который известен как потенцирующий GABA-эргическое ингибирование, уменьшает пачечную активность Na^+-зависимых потенциалов действия, но эти данные являются противоречивыми. Общий эффект этих блокаторов Na^+-каналов представляет собой смещение steady-state кривой инактивации Na^+-тока в более отрицательную сторону (к более отрицательным величинам). Кроме того, антиэпилептические препараты, подобные ламотригину, так же эффективны, как нейропротективные препараты в моделях инсульта или фокальной ишемии. Этот эффект коррелирует с подавлением выделения глутамата, который происходит, вероятно, вследствие влияния на Na^+-каналы.

Как сообщалось, антисудорожные препараты типа фенитоина (например, пропофол) осуществляют замедление восстановления от инактивации Na^+-каналов, что предполагает их действие на канал в инактивированном состоянии, которое было также описано для местных анестетиков. Длительная деполяризация эффективна для увеличения связывания препарата с местом связывания в канале и, следовательно, блока Na^+-каналов, что является совместимым с точкой зрения, согласно которой эти препараты связываются предпочтительно с Na^+-каналами, находящимися в инактивированном состоянии. В соответствии с данными экспериментов с мутациями местные анестетики и фенитоин могут разделять общий или перекрывающийся участок рецептора потому, что оба вещества вызывают сходные эффекты при связывании и блоке канала вследствие мутаций в месте связывания местных анестетиков.

Токсины использовались как селективные высокоаффинные вещества для изучения функций Na^+-каналов, и они конкурируют с действием блокаторов Na^+-каналов типа фенитоина. Блокаторы Na^+-каналов ингибируют связывание BTX (место связывания 2) в синаптосомах мозга и нейронах спинного мозга мыши, предполагая модуляцию связывания нейротоксина с участком рецептора 2. Кроме того, было показано, что выброс аминокислот, вызванный вератридином, ингибируется посредством антиэпилептического препарата ламотригина in vitro на срезах гиппокампа крысы и при patch clamp регистрации в конфигурации whole-cell.

В настоящее время неизвестно, действуют ли блокаторы Na^+-каналов на быструю или медленную инактивацию. Действия блокаторов Na^+-каналов сильнее выражено при более деполяризованных потенциалах, и это подчеркивает, что инактивированное состояние канала имеет намного более высокую аффинность к препарату, чем состояние покоя, как постулировалось в гипотезе модуляции рецептора. Было продемонстрировано, что фенитоин угнетает неактивированный Na^+-ток, который у изолированных нейронов из неокортикса и неостриатума крысы увеличивает возбудимость клеток вблизи порога возникновения пачки импульсной активности.

Стойкий Na^+-ток может влиять на поведение нейронов в условиях анормальной возбудимости, которая существует при эпилепсии. Стойкий Na^+-ток может быть важным компонентом общего Na^+-тока, вызывающего приступ. Такие стойкие токи, по-видимому, объясняют пейсмейкерные потенциалы, связанные с повторяющейся пачечной («взрывной») активностью. Было показано влияние фенитоина на позднее состояние открытия Na^+-канала в нейронах гиппокампа in vitro. Эти эффекты проявлялись при концентрациях, при которых быстрый (пиковый) Na^+-ток не возникал у покоящихся нейронов. Вследствие того что неактивирующиеся Na^+-токи возникают при более негативном потенциале, чем быстрые Na^+-токи, их угнетение может предотвратить деполяризацию мембраны прежде, чем нейрон начнет «разряжаться». Подобные результаты были получены рядом авторов. Эти данные позволяют представить новый механизм, который вносит вклад в фармакологический «профиль» антисудорожного препарата фенитоина, что было также показано для вальпроата.

Минимальные эффекты были обнаружены в различных нейронах, которые имели нормальные паттерны активности Na^+-каналов. Регистрация с помощью микроэлектродной техники биоэлектрической активности нейронов спинного мозга мыши показала, что фенитоин угнетал высокочастное «взрывное» возникновение потенциалов действия, вызванное длительными деполяризующими импульсами тока, не влияя на спонтанную активность нейронов. Угнетающее действие блокаторов Na^+-каналов сильно зависит как от мембранного потенциала, так и от частоты открытия каналов. Блокирование TTX αIIa Na^+-каналов мозга, находящихся в открытом состоянии (use-dependent block), было изучено на ооцитах *Xenopus*. Было показано, что аффинность связывания TTX возрастала при повторной стимуляции. Дозозависимый эффект фенитоина поддержал гипотезу о том, что потенциалзависимость тонического блока обусловлена более высокой аффинностью блокаторов Na^+-каналов для инактивированных состояний, а не для покоящихся каналов.

Эксперименты, выполненные на нейронах гиппокампа крысы in vitro, показывают, что действие фенитоина на канальном уровне тесно связано с состоянием быстрой инактивации Na^+-каналов. Связывание фенитоина с каналами в состоянии покоя приблизительно в 100 раз более слабое. Было высказано предположение, что рецептор к антисудорожным препаратам не может существовать в Na^+-каналах, находящихся в состоянии покоя. Таким образом, здесь может быть корреляция с конформационными изменениями рецептора в течение процесса открытия и закрытия ворот, и это может управляться мембранным потенциалом. Скорость связывания антисудорожных препаратов с рецептором, находящимся в состоянии, доступном для связывания, слишком мала для объяснения блокирующего действия этих блокаторов Na^+-каналов.

Как упомянуто, есть очевидные различия в химической структуре фенитоина, карбамазепина и ламотригина, поэтому интересно, что эти антисудорожные препараты, по-видимому, связываются с общим рецептором Na^+-каналов. Единственная общая черта в структуре этих препаратов связана с двумя группами фенила, отделенными одной или двумя связями: C—C или C—N. Предположим, что общий рецептор для антиэпилептических препаратов в инактивированном состоянии канала также содержит две группы фенила, которые, вероятно, являются частью боковых групп цепи некоторых ароматических аминокислот, формирующих канал. С этой точки зрения интересно, что мутации ароматических аминокислот (фенилаланин) нарушают связывание с каналами, находящимися в инактивированном состоянии. Эти результаты поддерживают гипотезу о том, что часть рецептора Na^+-каналов сформирована аминокислотными остатками фенилаланина или тирозина (положение 1764 и 1771) в домене IV трансмембранного сегмента S6 α-субъединицы.

Было показано, что возбудимость нейронов CA1 гиппокампа определенной линии крыс была увеличена. Величина амплитуды Na^+-тока также была увеличена (примерно на 20 %), как было показано методом patch-clamp в конфигурации whole-cell. Эти результаты интересны с позиций того, что определенная экспериментальная модель (kindling-модель) вовлекает много процессов, важных для патогенеза эпилепсии. В экспериментах, выполненных методом voltage-clamp в конфигурации whole-cell на изолированных гранулярных клетках зубчатого ядра, выделенных из гиппокампа пациентов с очагом эпелепсии в височной доле, устойчивой к терапевтическому воздействию, были выявлены ток большой плотности и присутствии компонента, показывающего медленное восстановление от инактивации.

Эксперименты на нейронах CA1 гиппокампа и нейронах, которые принадлежат височной доли неокортекса у пациентов с

резистентной к фармакологическому воздействию темпоральной долей и очагом эпилепсии в височной доле, с использованием метода voltage-clamp в конфигурации whole-cell не показали измененной модуляции Na^+-тока вальпроатом. Вызванная вальпроатом модуляция инактивации Na^+-тока не изменялась при kindling-эпилептогенезе у крыс. В отличие от этих результатов изучение на пациентах с очагом эпилепсии височной доли продемонстрировало, что модуляция инактивации Na^+-тока была только в 50 % случаев нейронах в CA1 пациентов с глубоким склерозом височной доли по сравнению с неокортикальными нейронами тех же самых пациентов и у половины нейронов CA1 пациентов без глубокого склероза височной доли.

Тот же эффект был найден у нейронов CA1, изолированных от эпилептического фокуса в kindling-модели у крыс. Быстрый компонент восстановления от инактивации не был затронут карбамазепином в сходных исследованиях на клетках гиппокампа, изолированных у пациентов с эпилепсией височной доли. Изменение экспрессии Na^+-каналов может быть ответственно за эти эффекты. Результаты указывают, что модуляция инактивации Na^+-тока является селективной для антиэпилептических препаратов.

8.10. Терапевтические возможности блокаторов Na^+-каналов

Эпилепсия. Упомянутые антиэпилептические препараты кроме ламотригина и топирамата эффективны против локальных и генерализованных приступов, но не могут использоваться для лечения в их отсутствие. Главный механизм действия антиконвульсантов, подобных антиэпилептику фенитоину, представляет собой, по-видимому, потенциалзависимую блокаду Na^+-каналов. Спектр антисудорожных блокаторов Na^+-каналов не идентичен. Есть три основные причины для различного действия препаратов: разная селективность для различных Na^+-каналов (типы I, II, IIa, III, IV), различия в их кинетическом действии или различия в их дополнительных действиях помимо действия на Na^+-каналы.

Существует потребность в поиске новых антиэпилептических препаратов, потому что приступы у одного из трех пациентов с эпилепсией устойчивы к лечению доступными в настоящее время антиконвульсантами. Знания о месте расположения участка рецептора для антиэпилептических препаратов, оказывающих терапевтическое воздействие через Na^+-каналы, улучшат понимание молекулярных механизмов блока каналов. Для лучшего понимания механизмов действия различных блокаторов на Na^+-каналы необходимо знать место связывания этих антисудорожных препаратов.

Недавнее клонирование и функциональная экспрессия различных типов Na^+-каналов создают полезную систему для дальнейшего поиска новых препаратов, действующих на различные типы Na^+-каналов. Ралитолин, новый блокатор Na^+-канала, не продемонстрировал никакого преимущества по сравнению со стандартными препаратами, такими как фенитоин или карбамазепин. Было показано, что эпилептические приступы многофакторны даже для одного и того же типа приступа, поэтому антисудорожные препараты с несколькими механизмами действия типа вальпроата имеют преимущества по сравнению с препаратами, оказывающими селективный эффект. Однако лучшее понимание патофизиологии эпилепсии и места связывания блокаторов Na^+-каналов может улучшить развитие селективных антиэпилептических препаратов с уменьшенными побочными эффектами. Мутагенез как подход может представлять собой многообещающий инструмент для характеристики места связывания для антиэпилептических срезов, которые облегчат создание более эффективных терапевтических антисудорожных препаратов. Кроме того, резистивность инактивации к карбамазепину может быть интересной концепцией для объяснения эпилепсии височной доли.

Нейропатическая боль. Блокаторы Na^+-каналов типа карбамазепина и низкие дозы лидокаина используют для лечения нейропатической боли (невралгия тройничного нерва или диабетическая невралгия и т.д.). Патофизиология этих заболеваний может включать увеличение числа Na^+-каналов и спонтанного возникновения потенциалов действия в периферийных нервах. Было продемонстрировано несколько препаратов, которые используются при хронической боли, чтобы ингибировать вератридинвызванный вход ионов Na^+. Исследования на моделях животных продемонстрировали уменьшение анормальной тонической активности ноцицепторных нейронов.

Нейропротекция. Существуют доказательства, полученные на моделях животных, что блокаторы Na^+-каналов являются нейропротекторами *при глобальной и фокальной ишемии. Несколько* блокаторов Na^+-каналов уменьшают повреждение мозга при ишемии в дозах, которые вызывают небольшие побочные эффекты, в противоположность антагонистам возбуждающих аминокислот или блокаторам L-типа Ca^{2+}-каналов. Кроме того, препараты типа рилузола уменьшают выброс глутамата при ишемии. Более того, протективное действие блокаторов Na^+-каналов было показано при гипоксическом повреждении межполушарных связей белого вещества (matter tracts) вследствие инсульта или неврологической травмы. Поэтому модуляторы Na^+-каналов могут быть с успехом предложены для лечения определенных типов инсульта, при которых повреждается белое вещество.

Модуляторы потенциалуправляемых Na^+-каналов в кардиологии. Не может быть сформулировано простое правило для лечения всех пациентов с сердечной недостаточностью из-за различной этиологии, особенности гемодинамики, клинических проявлений и степени выраженности (тяжести) сердечной недостаточности. Текущая терапия приемущественно базируется на комбинации мочегонного средства, вазодилататора или, что более предпочтительно, на ингибировании ангиотензинпревращающего фермента и обычно гликозида наперстянки. Главная цель в использовании диуретиков и вазодилататоров заключается в уменьшении пре- и постнагрузки, что ведет к уменьшению работы сердца.

Сердечные гликозиды используют преимущественно для увеличения силы сокращений сердца, которая ослаблена при сердечной недостаточности из-за систолической дисфункции. Препараты наперстянки, предложенные У. Витэрингом более 200 лет назад и все еще используемые как основной препарат с положительным инотропным эффектом, далеки от того, чтобы быть идеальным лекарством. Главная проблема с препаратом наперстянки и сходными веществами — низкий терапевтический индекс. Они могут легко вызвать опасные для жизни сердечные аритмии, тошноту, анорексию и нарушение зрения.

Несколько многообещающих соединений, подобных ингибиторам фосфодиэстеразы (милринон, вескаринон, пимобендан и т. д.), были синтезированы и изучены в 1990-х гг. Разочарование наступило после того, как было обнаружено, что эти препараты хотя и демонстрировали хороший короткодлящийся инотропный эффект при сердечной недостаточности, значительно увеличивали смертность, когда использовались в течение более длительного периода времени. Другой тип соединений, агонисты β-адренорецепторов, имеют много недостатков, подобно β-адренорецепторной внутриклеточной регуляции, при прогрессирующей сердечной недостаточности или вследствие их токсичности. Поэтому поиск и создание препаратов с положительным инотропным эффектом остается важной задачей в кардиофармакологии.

Один возможный подход к созданию препаратов, обладающих позитивным инотропным эффектом, может реализовываться посредством модуляции ионных каналов, приводящей к увеличению концентрации внутриклеточного кальция. Это может быть достигнуто посредством модуляции Ca^{2+}-, Na^+- и/или K^+-каналов. Главный клинический недостаток активаторов Ca^{2+}-каналов — их низкая селективность относительно каналов клеток сердца по сравнению с клетками сосудов, которая вызывает сильную вазоконстрикцию и повреждающие эффекты прежде всего в пределах центральной нервной системы. Наиболее многообещающими модуляторами каналов являются лекарства, которые увеличивают вход ионов Na^+ или уменьшают выход/утечку ионов K^+. Потенциал этих

препаратов для лечения пациентов с сердечной недостаточностью не до конца оценен вплоть до настоящего времени. Увеличение входа ионов Na^+ может быть достигнуто также путем активации канала, ингибирования инактивации канала или тем и другим.

Вещества, которые активируют Na^+-каналы подобно алкалоидам вератридину, BTX, аконитину или токсинам морских анемон, демонстрируют сильно выраженную проаритмическую и сосудосуживающую активность, ограничивающую их применение. Напротив, вещества, пролонгирующие открытие Na^+-каналов, подобно DPI 201-106 или BDF 9148, имеют намного бо́льшие перспективы для лечения пациентов с застойной сердечной недостаточностью. Главное преимущество этих препаратов по сравнению с другими модуляторами ионных каналов состоит в том, что они не вызывают аритмогенного эффекта и не проявляют сосудосуживающего действия, так как вероятность того, что Na^+-каналы клеток сосудов находятся в закрытом состоянии, выше, чем у каналов клеток миокарда. Кроме того, было установлено, что DPI 201-106 и BDF9148 оказывают сосудорасширяющий эффект, который является желательным для пациентов, страдающих сердечной недостаточностью.

Другая возможная комбинация действия модуляторов ионных каналов, которая может быть полезной в клинике, является сочетанием веществ, которые пролонгируют открытие Na^+-каналов кардиомиоцитов, что индуцирует положительный инотропный эффект, и K^+-каналов клеток сосудов, способствуя развитию вазодилатации. Хотя поиск идеальных лекарств с положительным инотропным эффектом все еще желателен для клиники, есть определенный пессимизм, касающийся поиска подходящих препаратов, вызывающих положительный инотропный эффект. Этот скептицизм основан на результате создания многочисленных препаратов (более 100), которые появились за прошедшие 20 лет и которые не были способны полностью удовлетворить все требования к селективности или низкой токсичности. Прогресс в этом направлении, видимо, будет идти медленно и лучшее понимание структуры каналов и их функций помогут в создании необходимых соединений.

8.11. Виды натриевых каналов

Как отмечалось, к семейству потенциалуправляемых Na^+-каналов относятся девять видов. С точки зрения их молекулярной организации все они имеют в основе α-субъединицу, которая может быть связана или не связана с другими субъединицами. Рассмотрим каждый из видов канала отдельно.

Натриевый канал $Na_V1.1$. Раньше потенциалуправляемый $Na_V1.1$-канал имел несколько разных названий, которые можно встретить в литературе: brain type I, rat 1, R-I, однако в настоящее время эти названия используются редко. Гены для $Na_V1.1$-канала были изолированы и охарактеризованы у человека: 2009aa, P35498, X65362, chr. 2q24, SCN1A; крысы: P04774, X03638; мыши: chr. 2. Было показано, что у $Na_V1.1$-канала с α-субъединицей связаны также β_1-, β_2- и β_3-субъединицы. Функциональный анализ этого канала был проведен методами voltage clamp и сективированного нейротоксинами перемещения ионов Na^+.

В результате экспериментов показано наличие I_{Na}-тока. Проводимость одиночного канала не определена. Селективность для ионов распределяется следующим образом: $Na^+ > K^+ > Ca^{2+}$. Получены данные, характеризующие процесс активации и инактивации этого канала: активация $V_a = -33$ мВ; инактивация $V_h = -72$ мВ с $\tau_h = 0{,}7$ мс при -10 мВ.

На рис. 8.32 показан входящий ток через $Na_V1.1$-каналы в контрольных экспериментах в культуре трех различных клеток HEK293 и steady-state-инактивация для каждой из клеток.

Активаторами для $Na_V1.1$-канала являются вератридин, батрахотоксин, аконитин, граянотоксин и родственные с ним природ-

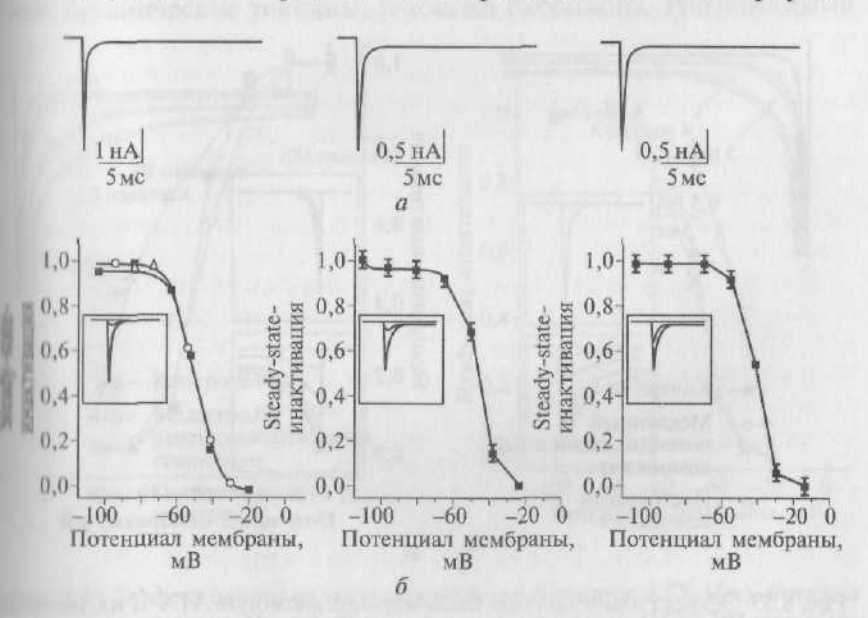


Рис. 8.32. Входящий ток через $Na_V1.1$-каналы:

а — регистрация входящего тока через $Na_V1.1$-каналы в контрольных экспериментах в культуре трех различных клеток HEK-293 при смещении потенциала от −110 до −20 мВ; *б* — steady-state-инактивация для каждой из клеток соответственно. Вставки демонстрируют наложение токов в контроле

ные органические токсины; β-токсин скорпиона. Ингибиторами воротного механизма служат α-токсин скорпиона, токсины морских анемонов, δ-конотоксин (медленная инактивация).

На рис. 8.33 в качестве примера показан эффект одного из токсинов морских анемон ATX-II из *Anemonia sulcata* на ток через $Na_V1.1$-каналы в культуре клеток HEK 293.

Селективными блокаторами являются тетродотоксин (EC_{50} = 6 нмоль/л), сакситоксин; местные анестетики, антиэпилептические препараты и антиаритмические лекарства. Известны радиоактивные лиганды [^{3}H]-сакситоксин, [^{3}H]-батрахотоксин, [^{125}I]-токсин скорпиона. Эти каналы распространены преимущественно в мембране нейронов центральной нервной системы и кардиомиоцитах. Показано, что их физиологической функцией является инициация потенциала действия и пачечной активности. Фармакологическое значение заключается в том, что этот тип канала является мишенью действия антиэпилептических препаратов. Это также потенциальный участок побочного действия местных анестетиков, попадающих в кровяное русло или цереброспинальную жидкость.

Мутации приводят к выраженной патологии. Точечные мутации и делеция (потеря интерстициального фрагмента хромосомы

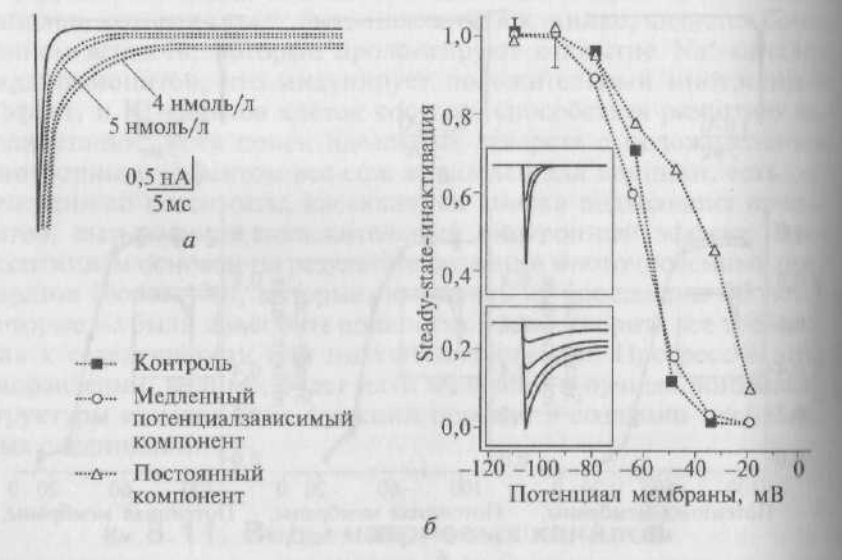


Рис. 8.33. Эффект одного из токсинов морских анемонов ATX-II из *Anemonia sulcata* на ток через $Na_V1.1$-каналы в культуре клеток HEK-293 при смещении потенциала от −110 до −20 мВ:

а — в контроле и при действии токсина в указанной концентрации; *б* — steady-state-инактивация при аппликации АТХ. Вставки демонстрируют наложение токов в контроле и под действием токсина

или хроматиды) вызывают приступы наследственной лихорадки и эпилепсии.

Натриевый канал $Na_V1.2$. Раньше потенциалуправляемый $Na_V1.2$-канал имел несколько разных названий, которые можно встретить в литературе: brain type II, rat II, R-II, однако в настоящее время эти названия используются редко. Гены для $Na_V1.2$-канала были изолированы и охарактеризованы у человека: 2005aa, Q99250, X65361, M94055, chr. 2q23-24, CN2A; крысы: P04775, X03630, X61149; мыши: chr.2. Было показано, что у $Na_V1.2$-канала с *α-субъединицей связаны также β_1-, β_2- и β_3-субъединицы.* Функциональный анализ этого канала был проведен методами voltage clamp и активированного нейротоксинами перемещения ионов Na^+.

В результате экспериментов показано наличие I_{Na}-тока. Проводимость одиночного канала не определена. Селективность для ионов распределяется следующим образом: $Na^+ > K^+ > Ca^{2+}$. Получены данные, характеризующие процесс активации и инактивации этого канала: *активация* $V_a = -24$ мВ с $\tau_a < 0{,}4$ мс: *инактивация* $V_h = -53$ мВ с $\tau_h = 8$ мс при -0 мВ.

Активаторами для $Na_V1.2$-канала являются вератридин, батрахотоксин, аконитин, граянотоксин и родственные с ним природные органические токсины, β-токсин скорпиона. Ингибиторами

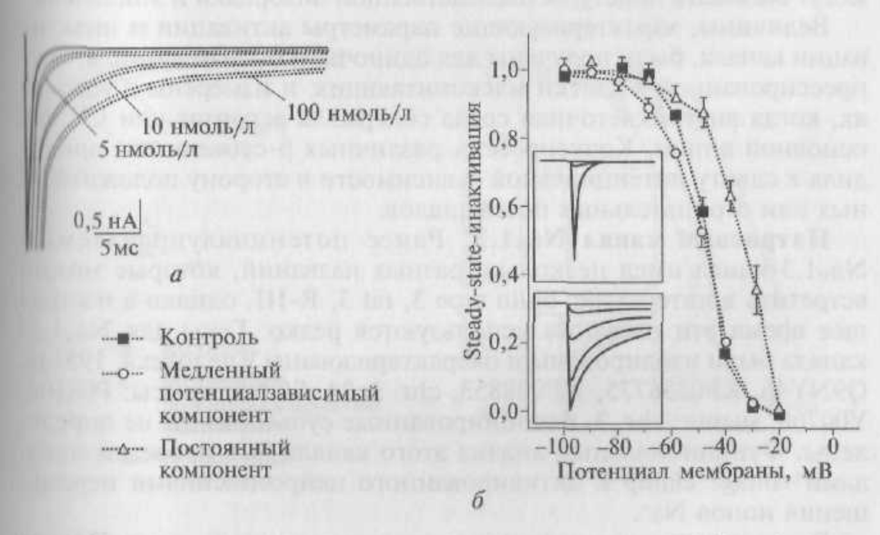


Рис. 8.34. Эффект одного из токсинов морских анемонов ATX-II из *Anemonia sulcata* на ток через $Na_V1.2$-каналы в культуре клеток HEK-293 при смещении потенциала от −110 до −20 мВ:

а — в контроле и при действии токсина в указанной концентрации; *б* — steady-state-инактивация при аппликации ATX-II. Вставки демонстрируют наложение токов в контроле и под действием токсина

воротного механизма служат α-токсин скорпиона, токсины морских анемонов, δ-конотоксин (медленная инактивация).

На рис. 8.34 в качестве примера показан эффект одного из токсинов морских анемонов ATX-II из *Anemonia sulcata* на ток через $Na_V1.2$-каналы в культуре клеток HEK 293.

Селективными блокаторами являются тетродотоксин (EC_{50} = = 12 нмоль/л), сакситоксин, местные анестетики, антиэпилептические препараты и антиаритмические лекарства (EC_{50} = 11 мкмоль/л для лидокаина при инактивированном состоянии канала).

Известны радиоактивные лиганды [^{3}H]-сакситоксин (K_d = = 1 нмоль/л), [^{3}H]-атрахотоксин, [^{125}I]-α-токсин скорпиона (K_d = = 2 нмоль/л), [^{125}I]-β-токсин скорпиона (K_d = 0,2 нмоль/л). Эти каналы распространены в аксонах нейронов центральной нервной системы — в немиелинизированных аксонах и на участках аксонов, не имеющих миелина. Установлено, что их физиологическими функциями являются инициация и проведение потенциала действия, инициация пачечной активности. Фармакологическое значение заключается в том, что этот тип канала является мишенью действия антиэпилептических препаратов. Это также возможный участок побочного действия местных анестетиков, которые достигают кровяного русла или цереброспинальной жидкости.

Мутации приводят к выраженной патологии. Точечные мутации могут вызывать приступы наследственной лихорадки и эпилепсию.

Величины, характеризующие параметры активации и инактивации канала, были получены для одиночной α-субъединицы, экспрессированной в клетки млекопитающих, и измерены в условиях, когда внутриклеточная среда содержала аспартат или Cl^- как основной анион. Коэкспрессия различных β-субъединиц приводила к сдвигу потенциальной зависимости в сторону положительных или отрицательных потенциалов.

Натриевый канал Na_V1.3. Ранее потенциалуправляемый $Na_V1.3$-канал имел несколько разных названий, которые можно встретить в литературе: brain type 3, rat 3, R-III, однако в настоящее время эти названия используются редко. Гены для $Na_V1.3$-канала были изолированы и охарактеризованы у человека: 1951aa, Q9NY46, XP0336775, NP008853, chr. 2q24, SCN3; крысы: P08104, Y00766; мыши: chr. 2. Ассоциированные субъединицы не определены. Функциональный анализ этого канала был проведен методами voltage clamp и активированного нейротоксинами перемещения ионов Na^+.

В результате экспериментов показано наличие I_{Na}-тока. Проводимость одиночного канала не определена. Селективность для ионов распределяется следующим образом: $Na^+ > K^+ > Ca^{2+}$. Получены данные, характеризующие процесс активации и инактивации этого канала: активация $V_a = -23$ мВ; инактивация $V_h = -69$ мВ с τ_h = = 0,8 мс при −10 мВ.

Активаторами для $Na_V1.3$-канала являются вератридин, батрахотоксин, аконитин, граянотоксин и родственные с ним природные органические токсины; β-токсин скорпиона. Ингибиторами воротного механизма служат α-токсин скорпиона, токсины морских анемон, δ-конотоксин (медленная инактивация).

На рис. 8.35 в качестве примера показан эффект одного из токсинов морских анемон ATX-II из *Anemonia sulcata* на ток через $Na_V1.3$-каналы в культуре клеток HEK 293.

Селективными блокаторами являются тетродотоксин (EC_{50} = ≈ 4 нмоль/л), сакситоксин, местные анестетики, антиэпилептические препараты и антиаритмические лекарства.

Известны радиоактивные лиганды [^{3}H]-сакситоксин, [^{3}H]-батрахотоксин, [^{125}I]-токсин скорпиона. Эти каналы распространены в нейронах центральной нервной системы. Они экспрессируются главным образом в эмбриональном и раннем пренатальном периоде; в мозге взрослой крысы локализуются преимущественно в мембране тел нервных клеток. Кроме того, они находятся в мембране кардиомиоцитов.

Установлено, что их физиологическими функциями являются инициация и проведение потенциала действия, инициация пачечной активности. Фармакологическое значение заключается в том, что этот тип канала является мишенью действия антиэпи-

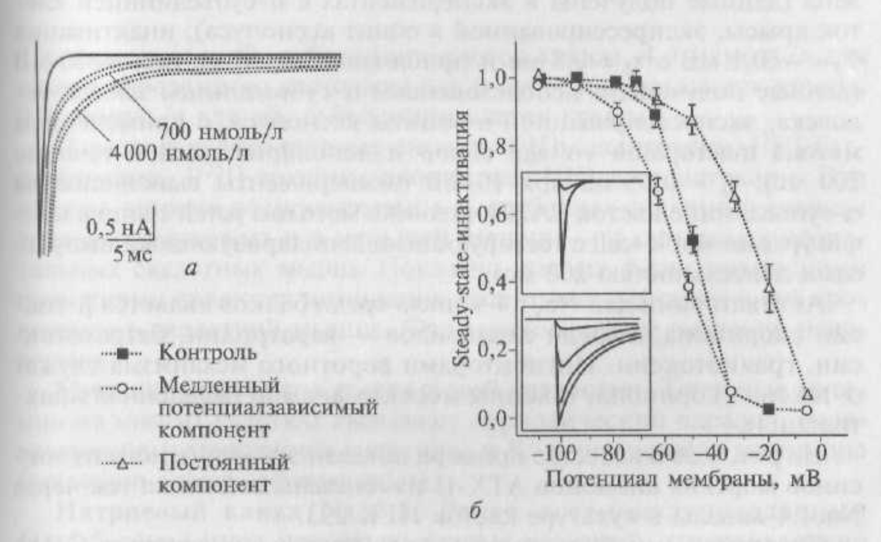


Рис. 8.35. Эффект одного из токсинов морских анемонов ATX-II из *Anemonia sulcata* на ток через $Na_V1.3$-каналы в культуре клеток HEK-293 при смещении потенциала от −110 до −20 мВ:

а — в контроле и при действии токсина в указанной концентрации; *б* — steady-state-инактивация при аппликации ATX-II; вставки демонстрируют наложение токов в контроле и под действием токсина

лептических препаратов. Это также возможный участок побочного действия местных анестетиков, которые достигают кровяного русла или цереброспинальной жидкости.

Мутации не выявлены.

Натриевый канал $Na_V1.4$. Раньше потенциалуправляемый $Na_V1.4$-канал имел несколько разных названий, которые можно встретить в литературе: SkM1 или μ1, однако в настоящее время эти названия используются редко. Гены для $Na_V1.4$-канала были изолированы и охарактеризованы у человека — 1836аа, M81758, O60217, Q9H3L9, 17q23-25, SCN4A; крысы — 1840аа, M26643, O70611; мыши — chr. 11, Q9ER60, Scn4A. Было показано, что у $Na_V1.4$-канала с α-субъединицей связана также β_1-субъединица. Функциональный анализ этого канала был проведен методами voltage clamp и активированного нейротоксинами перемещения ионов Na^+.

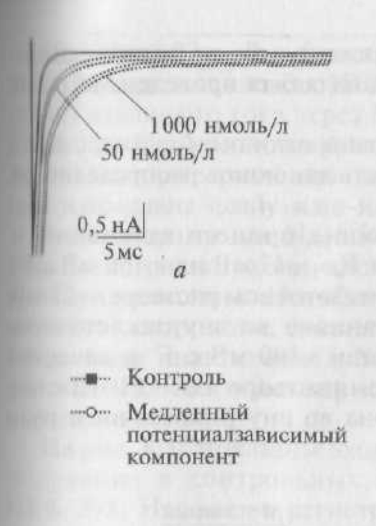
В результате экспериментов показано наличие I_{Na}-тока. Проводимость одиночного канала равна 24,9 пСм у клеток человека и 19,8 пСм у клеток крысы. Селективность для ионов распределяется следующим образом $Na^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+$ (для каналов, выделенных из сарколеммы скелетных мышц крысы).

Получены данные, характеризующие процесс активации и инактивации этого канала: активация $V_a = -30$ мВ, τ_a не установлена (данные получены в экспериментах с α-субъединицей клеток крысы, экспрессированной в ооцит ксенопуса); инактивация $V_h = -50,1$ мВ с $\tau_h = 0,8$ мс и приблизительно 8 мс при — 30 мВ (данные получены с использованием α-субъединицы клеток человека, экспрессированной в ооциты ксенопуса, с применением метода macropatch voltage clamp и деполяризацией в течение 200 мс); $\tau_h = 0,55$ мс при 10 мВ (эксперименты выполнены на α-субъединице клеток tsA201 человека методом patch clamp в конфигурации whole-cell с тестирующими деполяризующими импульсами длительностью 200 мс).

Активаторами для $Na_V1.4$-канала среди белков является β-токсин скорпиона, а среди алкалоидов — вератридин, батрахотоксин, граянотоксин. Ингибиторами воротного механизма служат α-токсин скорпиона, токсины морских анемон (медленная инактивация).

На рис. 8.36 в качестве примера показан эффект одного из токсинов морских анемонов ATX-II из *Anemonia sulcata* на ток через $Na_V1.4$-каналы в культуре клеток HEK 293.

Селективными блокаторами являются: μ-конотоксин GIIIA (EC_{50} = 19—54 нмоль/л у крыс, 1,2 мкмоль/л у человека); μ-конотоксин PIIIA (EC_{50} = 41 нмоль/л у крыс). Неселективные блокаторы: тетродотоксин (EC_{50} = 5 нмоль/л у крыс, 25 нмоль/л у человека), сакситоксин (EC_{50} = 4,1 нмоль/л у крыс), лидокаин (EC_{50} = = 2 128 мкмоль/л в покое у α-субъединицы клеток крысы,



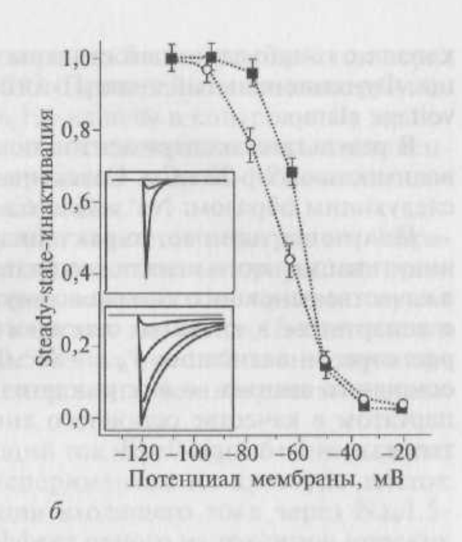


Рис. 8.36. Эффект одного из токсинов морских анемонов ATX-II из *Anemonia sulcata* на ток через $Na_V1.4$-каналы в культуре клеток НЕК-293 при смещении потенциала от −110 до −20 мВ:

а — в контроле и при действии токсина в указанной концентрации; *б* — steady-state-инактивация при аппликации ATX-II; вставки демонстрируют наложение токов в контроле и под действием токсина

176 мкмоль/л у $\alpha\beta_1$-субъединиц клеток крысы, 4,4 мкмоль/л для инактивированного состояния для α-субъединицы клеток крысы, 0,9 мкмоль/л для $\alpha\beta_1$-субъединиц клеток крысы).

Известны радиоактивные лиганды [^{3}H]-сакситоксин, [^{3}H]-батрахотоксин, [^{125}I]-токсины скорпиона, [^{3}H]-тетродотоксин. Эти *каналы широко распространены в мембранах скелетной мышцы* взрослых животных и в меньшей степени — в мембранах неонатальных скелетных мышц. Показано, что их физиологическими функциями являются инициация потенциала действия и его проведение в скелетной мышце. Фармакологическое значение неизвестно.

Мутации приводят к выраженной патологии. Точечные мутации во многих участках вызывают периодический паралич, парамиотонию (paramyotonia congenita) и K^+-отягощенную миотонию (potassium-aggravated myotonias).

Натриевый канал $Na_V1.5$. Ранее потенциалуправляемый $Na_V1.5$-канал имел несколько разных названий, которые можно встретить в литературе: h1, skm II, cardiac sodium channel, однако в настоящее время эти названия используют редко. Гены для $Na_V1.5$-канала были изолированы и охарактеризованы у человека — 2016aa, Q14524, M77235, chr. 2q24, SCN5a; крысы — P15389, A33996; мыши — NP067510, chr.2. Было показано, что у $Na_V1.5$-

канала с α-субъединицей связаны также β_1-, β_2- и β_3-субъединицы. Функциональный анализ этого канала был проведен методом voltage clamp.

В результате экспериментов показано наличие I_{Na}-тока с проводимостью 19—22 пСм. Селективность для ионов распределяется следующим образом: $Na^+ > K^+ > Ca^{2+}$.

Получены данные, характеризующие процесс активации и инактивации этого канала: активация $V_a = -47$ мВ или -56 мВ с F^- в качестве основного аниона во внутриклеточном растворе, -27 мВ с аспартатом в качестве основного аниона во внутриклеточном растворе; инактивация $V_h = -84$ мВ или -100 мВ с F^- в качестве основного аниона во внутриклеточном растворе или -61 мВ с аспартатом в качестве основного аниона во внутриклеточном растворе; $\tau_h = 1$ мс при 0 мВ.

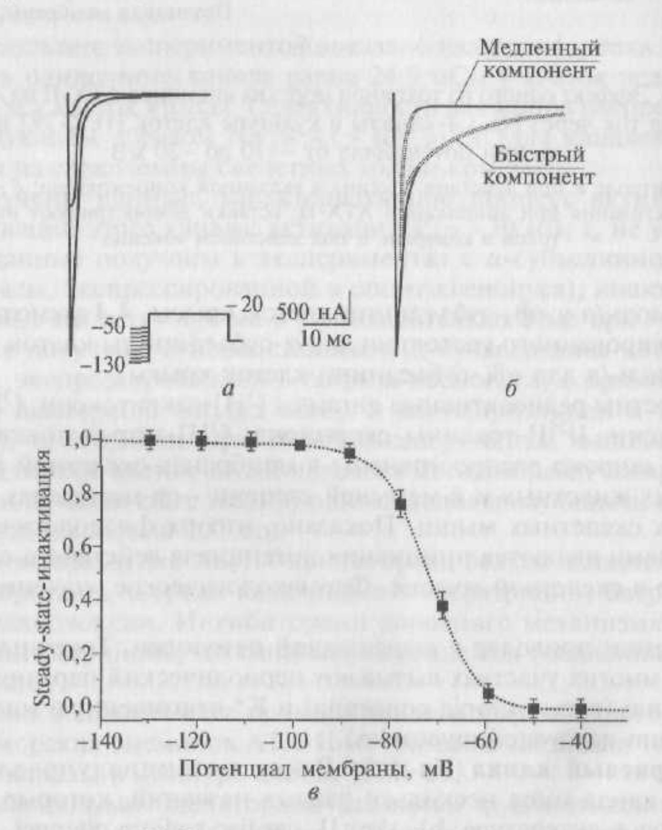


Рис. 8.37. Входящий ток через $Na_V1.5$-каналы:

а — наложение регистраций входящего тока через $Na_V1.5$-каналы в контрольных экспериментах на культуре клеток HEK-293; *б* — демонстрация двух экспоненциальных компонентов, на которые разложена контрольная кривая фазы инактивации; *в* — steady-state-инактивация в контроле

На рис. 8.37 в качестве примера показан входящий ток через $Na_V1.5$-каналы в клетках HEK-293. Проведено наложение регистраций входящего тока через $Na_V1.5$-каналы в контрольных экспериментах. Продемонстрированы две экспоненциальных компоненты, на которые разложена контрольная кривая фазы инактивации и показана steady-state-инактивация.

Активаторами для $Na_V1.5$-канала являются вератридин, батрахотоксин, граянотоксин, аконитин, родственные природные органические токсины. Ингибиторами воротного механизма служат α-токсин скорпиона, токсины морских анемонов, δ-конотоксин (медленная инактивация). $Na_V1.5$-канал имеет более низкую аффинность для α- и β-токсинов скорпиона, чем натриевые каналы нервных клеток.

На рис. 8.38 показаны входящий ток через $Na_V1.5$-каналы и его модуляция в контрольных экспериментах на культуре клеток HEK-293. Наложены регистрации входящего тока через $Na_V1.5$-каналы в контроле и показан эффект одного из токсинов морских анемонов ATX-II из *Anemonia sulcata* при смещении потенциала от –130 до –20 мВ. Представлены две экспоненциальные компоненты, на которые разложена контрольная кривая фазы инактивации и steady-state-инактивация в контроле и при аппликации ATX-II.

Блокаторами являются тетродотоксин (K_d = (1—2) мкмоль/л), сакситоксин, местные анестетики, антиэпилептики и антиаритмические препараты (EC_{50} = 16 мкмоль/л для лидокаинового блока инактивированных каналов); известный радиоактивный лиганд [^{3}H]-батрахотоксин (K_d = 25 нмоль/л в присутствии α-токсина скорпиона). Эти каналы широко распространены в мембране кардиомиоцитов, недоразвившихся и денервированных скелетных мышцах и некоторых нейронах головного мозга. Показано, что их физиологическими функциями являются инициация и проведение потенциала действия. Фармакологическое значение заключается в том, что этот тип канала служит мишенью действия антиаритмических препаратов. Это также возможный участок побочного действия местных анестетиков, попадающих в кровь.

Мутации приводят к выраженной патологии. Точечные мутации и делеция вызывают удлинение интервала *Q—T* и идиопатическую фибрилляцию желудочков вследствие медленной и неполной инактивации Na^+-тока кардиомиоцитов, ведущей к удлинению потенциалов действия.

Натриевый канал $Na_V1.6$. Ранее потенциалуправляемый $Na_V1.6$-канал имел несколько разных названий, которые можно встретить в литературе: NaCh6, PN4, Cer III, однако в настоящее время эти названия используются редко. Гены для $Na_V1.6$-канала были изолированы и охарактеризованы у человека — 1980aa, O95788, Q9NYX2, A9UQD0, AF050736, AF225988, chr. 12q13,

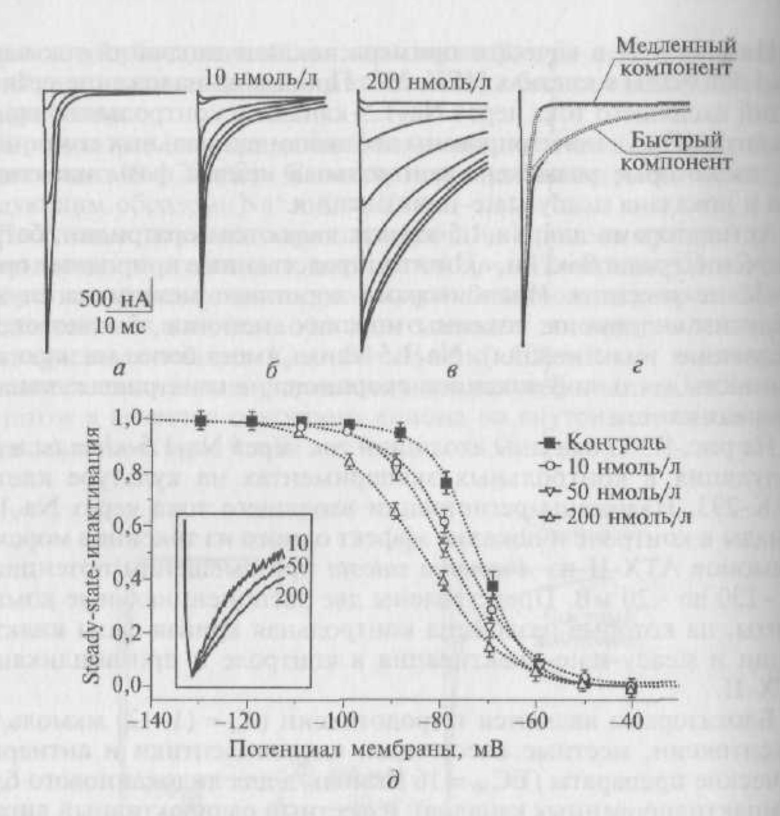


Рис. 8.38. Входящий ток через $Na_V1.5$-каналы и его модуляция:

а — наложение регистраций входящего тока через $Na_V1.5$-каналы в контрольных экспериментах на культуре клеток HEK-293; *б*, *в* — эффект одного из токсинов морских анемонов ATX-II из *Anemonia sulcata* на ток через $Na_V1.5$-каналы в культуре клеток HEK-293 при смещении потенциала от –130 до –20 мВ в контроле и при действии токсина в указанной концентрации; *г* — демонстрация двух экспоненциальных компонентов, на которые разложена контрольная кривая фазы инактивации; *д* — steady-state-инактивация в контроле и при аппликации ATX-II

SCN8A; крысы — 1976аа, L39018, AF049239, AF049240; мыши — 1976аа, Q60858, AF050736, AF225988, Scn8A.

Было показано, что у $Na_V1.6$-канала с α-субъединицей связаны также β_1- и β_2-субъединицы. Функциональный анализ этого канала был проведен методом voltage clamp. В результате экспериментов выявлено наличие I_{Na}-тока. Проводимость не была определена. Этот канал селективен для ионов Na^+.

Получены данные, характеризующие процесс активации и инактивации этого канала: активация $V_a = -8{,}8$ мВ, τ_a не определена (α-субъединица клеток мышей, экспрессированная в ооциты *Xenopus* и изученная методом cut-open oocyte voltage clamp); –17 мВ, τ_a не определена (α-субъединица клеток мышей с β_1- и

β₁-субъединицами, экспрессированными в ооциты *Xenopus* и изученные методом cut-open oocyte voltage clamp); –37,7 мВ, τ_a не определена (α-субъединица клеток крыс, экспрессированная в ооциты *Xenopus* и изученная методом macropatch voltage clamp); инактивация V_h = –55 мВ, τ_h = 1,2 и 2,1 мс при 10 мВ (α-субъединица клеток мышей, экспрессированная в ооциты *Xenopus* и изученная методом двухэлектродного стандартного voltage clamp с применением тестирующих деполяризующих импульсов длительностью 500 мс); –51 мВ, τ_h = 7,1 мс при –20 мВ (α-субъединица клеток мышей с β_1- и β_2-субъединицами, экспрессированные в ооциты *Xenopus* и изученные методом двухэлектродного стандартного voltage clamp с применением тестирующих деполяризующих импульсов длительностью 500 мс); –55 мВ, τ_h = 0,98 и 11,6 мс при 10 мВ (α-субъединица клеток мышей, экспрессированная в ооциты *Xenopus* и изученная методом двухэлектродного стандартного voltage clamp с применением тестирующих деполяризующих импульсов длительностью 500 мс); –51 мВ, τ_h = 0,78 и 8,1 мс при 10 мВ (α-субъединица с β_1- и β_2-субъединицами, экспрессированная в ооциты *Xenopus* и изученная методом двухэлектродного стандартного voltage clamp с применением тестирующих деполяризующих импульсов длительностью 500 мс); –97,6 мВ, τ_h = 1 мс при –30 мВ (α-субъединица клеток крыс, экспрессированная в ооциты *Xenopus oocytes* и изученная методом macropatch voltage clamp на фоне деполяризации длительностью 5 с).

Активаторами для $Na_V1.6$-канала являются вератридин и батрахотоксин (данные базируются на исследовании Na^+-каналов клеток мозга крыс). Ингибиторами воротного механизма служат α-токсин скорпиона, токсины морских анемонов (возможный блок инактивации, базирующийся на изучении $Na_V1.2$-канала).

На рис. 8.39 представлен эффект одного из токсинов морских анемонов ATX-II из *Anemonia sulcata* на ток через $Na_V1.6$-каналы в культуре клеток HEK 293 при смещении потенциала от –110 до –20 мВ в контроле и при действии токсина в указанной концентрации.

Неселективными блокаторами являются тетродотоксин (EC_{50} = = 1 нмоль/л у крыс, 6 нмоль/л у мышей), сакситоксин. Известные радиоактивные лиганды [^{125}I]-токсины скорпиона, [^{3}H]-батрахотоксин, [^{3}H]-сакситоксин, [^{3}H]-тетродотоксин (данные базируются на исследовании Na^+-каналов клеток мозга крыс). Каналы $Na_V1.6$ распространены на мембране дендритов нейронов, образующих структуры выхода (нисходящие пути) из мозжечка, коры мозга и гиппокампа, в клетках Пуркинье коры мозжечка, стволе мозга и спинном мозге, астроцитах и шванновских клетках; перехватах Ранвье в чувствительных и двигательных аксонах периферических нервов, перехватах Ранвье аксонов, образующих проводящие пути внутри центральной нервной системы. Показано, что

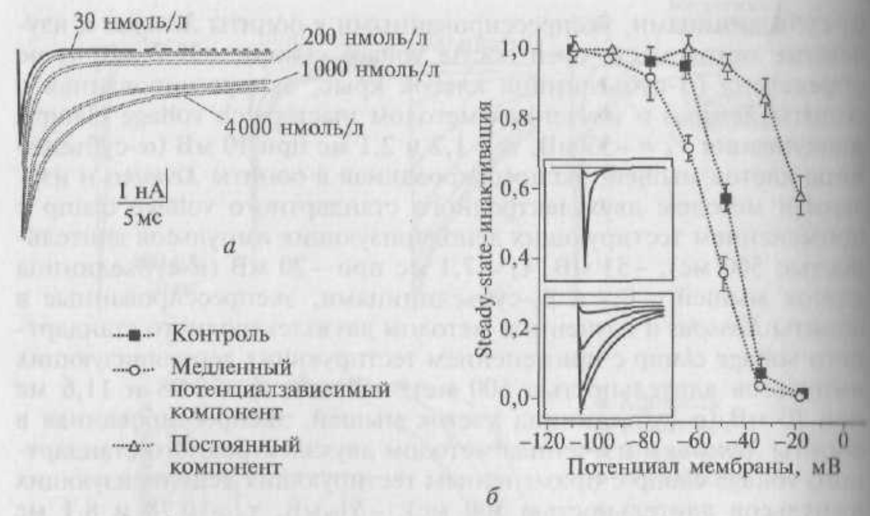


Рис. 8.39. Эффект одного из токсинов морских анемонов ATX-II из *Anemonia sulcata* на ток через $Na_V1.6$-каналы в культуре клеток HEK-293 при смещении потенциала от −110 до −20 мВ:

а — в контроле и при действии токсина в указанной концентрации; *б* — steady-state-инактивация при аппликации ATX-II; вставки демонстрируют наложение токов в контроле и под действием токсина

их физиологическими функциями являются инициирование и проведение потенциала действия в нейронах ЦНС и их миелинизированных аксонах. Кроме того, они ответственны за ток в клетках Пуркинье мозжечка.

Фармакологическое значение заключается в том, что канал является потенциальной мишенью для антиэпилептических и болеутоляющих препаратов.

Мутации приводят к выраженной патологии. Точечные мутации в DIIS4—S5 вызывают мозжечковую атоксию у *jolting* мышей. Разрушение гена вызывает болезнь двигательной системы, основанную на патологии в области концевых пластинок у мышей.

Натриевый канал $Na_V1.7$. Ранее потенциалуправляемый $Na_V1.7$-канал имел несколько разных названий, которые можно встретить в литературе: PN1, hNE-Na, Nas, однако в настоящее время эти названия используются редко. Гены для $Na_V1.7$-канала были изолированы и охарактеризованы у человека — 1977aa, X82835, chr. 2q24, SCN9A; крысы — 1984aa, AF000368, U79568; мыши — chr. 2, Scn9A. Было показано, что у $Na_V1.7$-канала с α-субъединицей связаны также β_1- и β_2-субъединицы. Функциональный анализ этого канала был проведен методами voltage clamp и активированного нейротоксинами перемещения ионов Na^+.

В результате экспериментов выявлено наличие I_{Na}-тока с проводимостью 19,5 пСм (для ТТХ-сенситивного тока в DRG нейронах). Этот канал селективен для ионов Na^+.

Получены данные, характеризующие процесс активации и инактивации этого канала: активация $V_a = -31$ мВ, τ_a не измерена (α-субъединица клеток крыс, экспрессированная в ооциты *Xenopus* и изученная методом macropatch); –45 мВ, τ_a не измерена (для ТТХ-сенситивного тока в некоторых нейронах); инактивация $V_h = -78$ мВ, $\tau_h = 0{,}46$ и 20 мс при –30 мВ (α-субъединица крысы, экспрессированная в ооциты *Xenopus* с деполяризацией в течение 10 с при использовании двухэлектродного voltage clamp); –78 мВ, τ_h = 0,46 и 20 мс при –30 мВ, τ_h = 0,1 и 1,8 мс при 10 мВ (α-субъединица крысы, экспрессированная в ооциты *Xenopus* с деполяризацией в течение 10 с при использовании двухэлектродный voltage clamp); –60,5 мВ (α-субъединица человека экспрессированная в НЕК-клетки с деполяризацией в течение 2 с при применении whole-cell patch clamp); –39,6 мВ (α-субъединица человека с β_1-субъединицей, экспрессированная в НЕК-клетки с деполяризацией в течение 2 с при использовании whole-cell patch clamp); –65 мВ (для ТТХ-сенситивного тока в DRG-нейронах с деполяризацией от 50 мс до 1 с при использовании whole-cell patch clamp).

Активаторами для $Na_V1.7$-канала являются вератридин, батрахотоксин (данные базируются на исследовании Na^+-каналов клеток мозга крыс). Ингибиторами воротного механизма служат α-токсин скорпиона, токсины морских анемонов (возможно, блок инактивации базируется на изучении $Na_V1.2$).

Неселективными блокаторами являются тетродотоксин (EC_{50} = = 4 нМ у крыс, 25 нмоль/л у человека) и сакситоксин. Известные радиоактивные лиганды: [^{125}I]-токсин скорпиона, [^{3}H]-батрахотоксин, [^{3}H]-сакситоксин, [^{3}H]-тетродотоксин (данные базируются на исследовании Na^+-каналов клеток мозга крыс). Каналы $Na_V1.7$ распространены во всех типах DRG-нейронов, симпатических нейронах, шванновских клеток и нейроэндокринных клетках. Показано, что их физиологическими функциями являются инициирование потенциала действия и передача в нейронах. Фармакологическое значение заключается в том, что канал является потенциальной мишенью для местных анестетиков в периферической нервной системе.

Мутации и патология не определены.

Натриевый канал Na_V1.8. Ранее потенциалуправляемый $Na_V1.8$-канал имел несколько разных названий, которые можно встретить в литературе: SNS, PN3, однако в настоящее время эти названия используются редко. Гены для $Na_V1.8$-канала были изолированы и охарактеризованы: у человека — 1957аа, Q9Y5Y9, NM 006514, chr. 3P21-3P24, SCN10A; крысы — Q63554, Q62968,

NM 017247, U53833; мыши — P70276, NM 009134, chr. 9. Субъединицы, связанные с α-субъединицей, у $Na_V1.8$-канала не определены. Функциональный анализ этого канала был проведен методом voltage clamp.

В результате экспериментов показано наличие $I_{TTX\text{-}Rslow}$-тока. Проводимость не определена. Этот канал селективен для ионов Na^+.

Получены данные, характеризующие процесс активации и инактивации этого канала. Порог активации лежит в диапазоне от −40 до −30 мВ (крыса DRG): активация V_a составляет от −16 до −21 мВ (нейроны крысы DRG), τ_a = 0,54 мс при −20 мВ и 0,36 мс при −10 мВ; инактивация V_h = −30 мВ (нейроны крысы DRG), τ_h = 13,5 мс при −20 мВ и 5,6 мс при −10 мВ.

Активаторы не обнаружены. Ингибиторы воротного механизма не определены. Блокаторами являются тетродотоксин (ТТХ-нечувствительность, EC_{50} = 60 мкмоль/л), лидокаин (а возможно, и другие местные анестетики) при высоких концентрациях. Радиоактивных лигандов нет.

Каналы $Na_V1.8$ распространены в мелких и средних DRG-нейронах и их аксонах. Установлено, что их физиологической функцией является внесение существенного вклада во входящий ток, лежащий в основе потенциала действия в DRG-нейронах, и добавление медленно инактивирующегося компонента натриевого тока.

Фармакологическое значение заключается в том, что канал является потенциальной мишенью для обезболивающих препаратов.

Мутации приводят к выраженной патологии. Точечная мутация, заключающаяся в замене Ser356 на ароматический остаток, устраняет ТТХ-резистентность; $Na_V1.8$-ноль мыши показывают ослабленный болевой ответ на механическое болевое раздражение, задержанное развитие повышенной болевой чувствительности при воспалении, и небольшой дефицит терморецепторов, связанных с болевым ответом; предполагают роль $Na_V1.8$-каналов в генезе болевой чувствительности и хронической боли; $Na_V1.8$ подвергается внутриклеточной регуляции в некоторых моделях боли вследствие воспаления.

У канала наблюдается быстрое восстановление от инактивации под влиянием пептида из трех аминокислот (NGF) и фактора роста глиальных клеток (GDNF).

Натриевый канал $Na_V1.9$. Ранее потенциалуправляемый $Na_V1.9$-канал имел несколько разных названий, которые можно встретить в литературе: NaN, SNS-2. В настоящее время эти названия используются редко. Гены для $Na_V1.9$-канала были изолированы и охарактеризованы: у человека — 1792aa, Q9UHE0, AF188679, chr. 3p21—3p24, SCN11A; крысы — 1765aa, 088457, NM 019265,

AJ237852; мыши — 1765aa, Q9R053, NM 011887, chr. 9. *Субъединицы, связанные с α-субъединицей*, у $Na_V1.9$-канала не определены. Функциональный анализ этого канала был проведен методом voltage clamp.

В результате экспериментов показано наличие $I_{NaTTX-BR}$-тока. Проводимость не определена. Этот канал селективен для ионов Na^+.

Получены данные, характеризующие процесс активации и инактивации этого канала. Порог активации лежит в диапазоне от *–70 до –60 мВ (DRG-нейроны крысы) и –80 мВ (человек)*. Активация V_a составляет от –47 до –54 мВ (крыса DRG), τ_a = 2,92 мс при –60 мВ, 4,1 мс при –50 мВ, 3,5 мс при –20 мВ и 2,5 мс при –10 мВ. Инактивация V_h составляет от –44 до –54 мВ, τ_h равна 843 мс при –60 мВ, 460 мс при –50 мВ, 43 мс при –20 мВ и 16 мс при –10 мВ.

Активаторы не обнаружены. Ингибиторы воротного механизма не определены. Блокаторами являются тетродотоксин (TTX-нечувствительный, EC_{50} = *40 мкмоль/л). Радиоактивных лигандов нет.*

Каналы $Na_V1.9$ распространены в с-типе DRG-нейронов, нейронах ядра тройничного нерва и их аксонах. Показано, что их физиологической функцией являются сдвиг потенциала покоя в сторону деполяризации, увеличение медленной подпороговой деполяризации. Фармакологическое значение заключается в том, что канал является потенциальной мишенью для обезболивающих препаратов.

Мутации приводят к выраженной патологии. *Предпочтительная экспрессия в с-типе DRG-нейронов предполагает роль в ноцицепции.*

Экспрессия регулируется фактором роста глиальных клеток (GDNF).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Catterall W.A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels // Neuron. — 2000. — V. 26. — P. 13—25.

Cestule S. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels / S. Cestule, W. A. Catterall // Biochimie. — 2000. — V. 82. — P. 883—892.

Chen Y.H. Cloning, distribution and functional analysis of the type III sodium channel from human brain / Y. H. Chen, T. J. Dale, M. A. Romanos et al. // Eur. J. Neurosci. — 2000. — V. 12. — P. 4281—4289.

Clare J.J. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets / J. J. Clare, S. N. Tate, M. Nobbs, M. A. Romanos // Drug Discov. Today. — 2000. — V. 5. — P. 506—520.

Cummins T.R. GDNF up-regulates expression of functional SNS and NaN sodium channels and their currents in axotomized DRG neurons /

T. R. Cummins, J. A. Black, S. D. Dib-Hajj, S. G. Waxman // J. Neurosci. — 2000. — V. 20. — P. 8754—8761.

Ertel E. A. Nomenclature of voltagegated calcium channels / E. A. Ertel, K. P. Campbell, M. M. Harpold et al. // Neuron. — 2000. — V. 25. — P. 533—535.

Goldin A. L. Nomenclature of voltagegated sodium channels / A. L. Goldin, R. L. Barchi, J. H. Caldwell et al. // Neuron. — 2000. — V. 28. — P. 365—368.

Goldin A. L. Resurgence of sodium channel research // Ann. Rev. Physiol. — 2001. — V. 63. — P. 871—94.

Herzog R. I. Persistent TTX-resistant Na^+ current affects resting potential and response to depolarization in simulated spinal sensory neurons / R. I. Herzog, T. R. Cummins, S. G. Waxman // J. Neurophysiol. — 2001. — V. 86. — P. 1351—1364.

Isom L. L. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary // Neuroscientist. — 2001. — V. 7. — P. 42—54.

Kaplan M. R. Differential control of clustering of the sodium channels $Na_V1.2$ and $Na_V1.6$ at developing CNS nodes of Ranvier / M. R. Kaplan, M. H. Cho, E. M. Ullian et al. // Neuron. — 2001. — V. 30. — P. 105—119.

Keating M. T. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias / M. T. Keating, M. C. Sanguinetti // Cell. — 2001. — V. 104. — P. 569—580.

Kimura T. Novel site on sodium channel α-subunit responsible for the differential sensitivity of grayanotoxin in skeletal and cardiac muscle / T. Kimura, K. Yamaoka, E. Kinoshita et al. // Mol. Pharmacol. — 2001. — V. 60. — P. 865—872.

Li R. A. Structural basis of differences in isoform-specific gating and lidocaine block between cardiac and skeletal muscle sodium channels / R. A. Li, I. L. Ennis, G. F. Tomaselli, E. Marban // Mol. Pharmacol. — 2002. — V. 61. — P. 136—141.

Maier S. K. An unexpected role for brain-type sodium channels in coupling of cell surface depolarization to contraction in the heart / S. K. Maier, R. E. Westenbroek, K. A. Schenkman et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — V. 99. — P. 4073—4078.

Mantegazza M. Role of the C-terminal domain in inactivation of brain and cardiac sodium channels / M. Mantegazza, F.H. Yu, W. A. Catterall, T. Scheuer // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2001. — V. 98. — P. 15348—15353.

Nau C. Interaction of local anesthetics with voltage-gated Na^+ channels / C. Nau, G. K. Wang // J. Membrane Biol. — 2004. — V. 201. — P. 1 — 8.

Penzotti J. L. Specific neosaxitoxin interactions with the Na^+ channel outer vestibule determined by mutant cycle analysis / J. L. Penzotti, G. Lipkind, H. A. Fozzard, S. C. Dudley Jr. // Biophys. J. — 2001. — V. 80. — P. 698—706.

Qu Y. Differential modulation of sodium channel gating and persistent sodium currents by the β_1, β_2, and β_3 subunits / Y. Qu, R. Curtis, D. Lawson et al. // Mol. Cell. Neurosci. — 2001. — V. 18. — P. 570—580.

Renganathan M. Contribution of $Na_V1.8$ sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons / M. Renganathan, T. R. Cummins, S. G. Waxman // J. Neurophysiol. — 2001. — V. 86. — P. 629—640.

Safo P. Distinction among neuronal subtypes of voltage-activated sodium channels by μ-conotoxin PIIIA / P. Safo, T. Rosenbaum, A. Shcherbatko et al. // J. Neurosci. — 2000. — V. 200. — P. 76—80.

Sleeper A.A. Changes in expression of two tetrodotoxin-resistant sodium channels and their currents in dorsal root ganglion neurons following sciatic nerve injury, but not rhizotomy / A. A. Sleeper, T. R. Cummins, W. Hormuzdiar et al. // J. Neurosci. — 2000. — V. 20. — P. 7279—7289.

Spampanato J. Functional effects of two voltage-gated sodium channel mutations that cause generalized epilepsy with febrile seizures plus type 2 / J. Spampanato, A. Escayg, M. H. Meisler, A. L. Goldin // J. Neurosci. — 2001. — V. 21. — P. 7481—7490.

Sugawara T. A missense mutation of the Na+ channel alpha II subunit gene $Na_V1.2$ in a patient with febrile and afebrile seizures causes channel dysfunction / T. Sugawara, Y. Tsurubuchi, K. L. Agarwala et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2001. — V. 98. — P. 6384—6389.

Tzoumaka E. Differential distribution of the tetrodotoxin-sensitive rPN4/NaCh6/Scn8a sodium channel in the nervous system / E. Tzoumaka, A. C. Tischler, L. Sangameswaran et al. // J. Neurosci. Res. — 2000. — V. 60. — P. 37—44.

ГЛАВА 9

ПОТЕНЦИАЛУПРАВЛЯЕМЫЕ КАЛЬЦИЕВЫЕ КАНАЛЫ

9.1. Кальциевые токи

Потенциалуправляемые Ca^{2+}-каналы позволяют ионам Ca^{2+} входить в клетки, когда мембрана деполяризована. Роль Ca^{2+}-каналов особенно значительна для взаимосвязи электрических потенциалов, возникающих на мембране клетки, с физиологическими процессами, происходящими внутри клетки. Повышение цитозольной концентрации Ca^{2+} вызывает различные клеточные реакции, например сокращение, секрецию, выброс медиатора, процессы транскрипции.

Кальциевые каналы являются членами суперсемейства трансмембранных белков ионных каналов, которое включает также потенциалуправляемые K^+- и Na^+-каналы. Они представляют собой комплекс белков, образованный из четырех или пяти субъединиц, — α_1-субъединицы, и вспомогательных $\alpha_2\delta$-, β- и γ-субъединиц. Субъединица α_1 формирует проводящую пору и содержит сенсор напряжения и аппарат ворот канала. Петля между трансмембранными сегментами S5 и S6 в каждом домене определяет селективность и проводимость канала. Селективный фильтр Ca^{2+}-канала должен узнать ион Ca^{2+} уже на входе в канал. Эти события достаточно редки по сравнению с входами ионов Na^+, количество которых во внеклеточной среде примерно в 100 раз больше. Хотя ионы Ca^{2+} и Na^+ имеют идентичный диаметр (2 Å), канал может выбирать Ca^{2+} в большей степени, чем Na^+, в соотношении 1 000 : 1. Ни одно сито не может так эффективно дифференцировать ионы идентичного размера. Скорее всего пора содержит специфическое место, которое способно связывать Ca^{2+} при его очень низких концентрациях в растворе (10^{-6} М), а все другие физиологические ионы связывает в значительно более высоких концентрациях.

Такое высокоаффинное место связывания должно освобождать Ca^{2+} очень медленно. Рассмотрим реакцию $Ca^{2+} + S \rightleftharpoons Ca{-}S$ с константой диссоциации ($K_d = k_{off}/k_{on}$)10^{-6} М. Если Ca^{2+} поступа-

ет так быстро, как позволяет диффузия (~ 10^{-9} $M^{-1} \cdot c^{-1}$), тогда скорость прохождения ионов Ca^{2+} (реакции off-rate) является максимально равной 10^3 ионов в секунду. Однако одиночные Ca^{2+}-каналы генерируют токи пикоамперного диапазона, т.е. переносят примерно 10^6 ионов в секунду. Это несоответствие является в определенной мере парадоксом. Как может Ca^{2+} проходить через Ca^{2+}-каналы в 1 000 раз быстрее, чем позволяет теоретический максимум его медленной диссоциации от высокоаффинного места связывания?

В современной литературе представлены данные о структуре места связывания Ca^{2+} в каналах и обсуждаются возможные механизмы селективного связывания и бысторого освобождения ионов Ca^{2+}.

Принципиальным является наличие в α_1-спирали канала четырех глютаматных остатков, названных EEEE-локусом. Изучение работы Ca^{2+}-канала было облегчено за счет его аналогии (однако неполной) с K^+-каналами, чъя атомная структура уже известна. Пора K^+-каналов, образованная аминокислотами треонина (Thr), валина (Val), тирозина (Tyr) и глицина (Gly), стабилизируется атомами кислорода основной молекулы порообразующего белка. В случае же Ca^{2+}-канала карбоксильные группы глутаматов, формирующих пору (EEEE-локус), также направлены в полость поры.

В настоящее время рассматриваются доказательства необходимости EEEE-локуса и обсуждаются вопросы, почему необходимо, чтобы эти боковые карбоксильные группы были направлены в полость поры, а также теории о том, как обеспечивается высокая проводимость канала при высокоэффективной селективности его фильтра.

Кальциевые каналы были обнаружены практически во всех клетках. Кальциевые токи, зарегистрированные в различных типах клеток, имеют определенные физиологические и фармакологические свойства. Изначальная буквенная номенклатура была предложена, исходя из кинетик Ca^{2+}-токов.

L-тип (long-lasting — долгодлящийся) Ca^{2+}-токов требует сильной деполяризации для активации, он долгодлящийся и блокируется органическими антагонистами L-типа Ca^{2+}-каналов, включая дигидропиридины, фенилалкиламины и бензотиазепины. Этот тип является главным Ca^{2+}-током в мышцах и эндокринных клетках, где инициирует сокращение и секрецию.

N-тип (от neither long nor transient — ни L ни T), P/Q-тип и R-тип кальциевых токов также требуют сильной деполяризации для активации. Они относительно нечувствительны к антагонистам L-типа Ca^{2+}-каналов, но блокируются специфическими полипептидными токсинами из ядов улитки или паука. Эти токи в основном выражены в нейронах, где они инициируют нейротран-

смиттерные процессы для большинства быстрых синапсов и так же опосредуют вход Ca^{2+} в клеточные тела и дендриты.

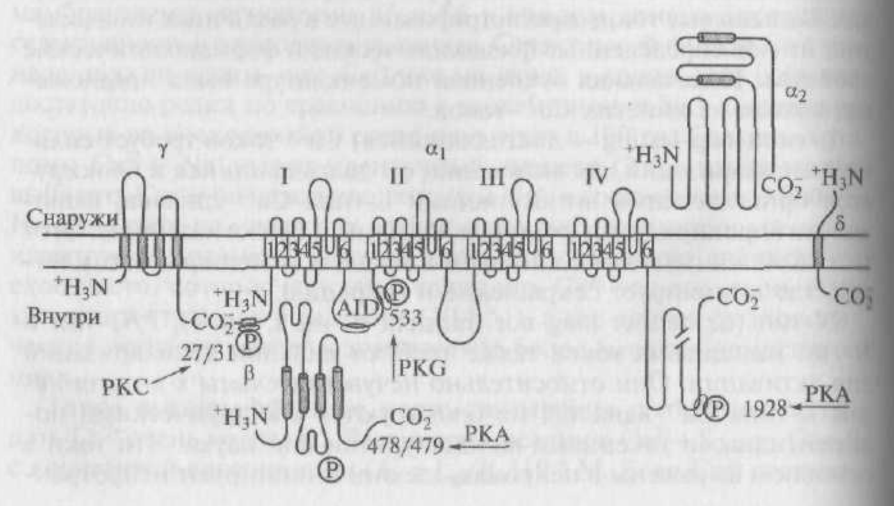
Т-тип (transient — преходящий) Ca^{2+}-токов активируется слабой деполяризацией; эти токи мимолетные (преходящие). Они не чувствительны к органическим антагонистам и токсинам змей и пауков, которые используются для определения N- и P/Q-типа Ca^{2+}-токов. Т-тип Ca^{2+}-токов выражен в широком спектре клеточных типов, в которых он вовлечен в развитие потенциала действия, и важен в клетках/тканях, обладающих ритмической активностью.

9.2. Молекулярная организация кальциевого канала

9.2.1. Общая характеристика кальциевого канала

Кальциевые каналы, которые были охарактеризованы биохимическими методами, представляют собой комплекс белков, образованный из четырех или пяти определенных субъединиц (рис. 9.1 и рис. 9.2), которые кодируются большим семейством генов.

На молекулярном уровне Ca^{2+}-канал составлен из формирующей пору трансмембранной α_1-субъединицы и вспомогательных $\alpha_2\delta$-, β- и γ-субъединиц. При этом α_2-субъединица находится на внешней стороне мембраны, β-субъединица — на внутренней, а δ- и γ-субъединицы представляют собой трансмембранные струк-



туры. Структура Ca^{2+}-канала сердечной и гладкой мышцы — это структура с четырьмя субъединицами канала; она подобна структуре Ca^{2+}-канала нейрона. Вспомогательные $\alpha_2\delta$- и β-субъединицы увеличивают транспорт ионов Ca^{2+} через пору, образованную α_1-субъединицей, и модулируют потенциалзависимую кинетику канала. Внутриклеточная β-субъединица и трансмембранный дисульфидсвязанный комплекс $\alpha_2\delta$-субъединиц являются компонентами большинства типов Ca^{2+}-каналов. В дополнение к роли β-субъединицы в транспорте ионов через канал она также играет принципиальную роль в электромеханическом сопряжении в мышечных волокнах скелетных мышц. Взаимодействия $\alpha_2\delta$- и β-субъединиц в настоящее время хорошо изучены. Наличие γ-субъединицы было также обнаружено в Ca^{2+}-каналах скелетных мышц, в кардиомиоцитах и нейронах головного мозга. Хотя эти добавочные субъединицы модулируют свойства ионного канала, фармакологические и электрофизиологические особенности Ca^{2+}-каналов в основном связаны с существованием α_1-субъединиц.

β-Субъединицы Ca^{2+}-каналов способны формировать гетерогенные комплексы in vivo и in vitro; β-субъединицы и α_1-субъединица обладают консервативными областями взаимодействия, что позволяет формирование гетерогенных комплексов канала. $\alpha_2\delta$-Субъединицы модулируют различные α_1-субъединицы in vitro; возможно, эта гетерогенность распространяется на ситуации in vivo. Такое разнообразие взаимодействия субъединиц потенциально увеличило бы число возможных вариантов каналов с отличающими-

---

Рис. 9.1 Структура Ca_V1-каналов мембран клеток сердечной и гладкой мышцы на уровне субъединиц и места фосфорилирования протеинкиназами. Показаны основная α_1-субъединица, формирующая пору, и связанные с ней вспомогательные субъединицы. Модель выполнена на основе экспериментальных данных изучения структуры Ca^{2+}-каналов, состоящих из пяти субъединиц. В дополнение к α_1-субъединице представлены внутриклеточно локализованная β-субъединица и внеклеточно расположенная α_2-субъединица, связанная дисульфидной связью с δ-субъединицей в $\alpha_2\delta$-комплекс. Предполагаемые α-спирали представлены как цилиндры. Масштаб длины линий приблизительно соответствует длине полипептидных сегментов. Участки различий в α_1-субъединице между каналами мембран клеток сердечной и гладкой мышцы расположены в NH_2-концевой части, в гидрофобных сегментах DIS6 и DIVS3 и в линкере (цитоплазматическом связующем участке) между доменами I и II: AID — первичная область связывания для всех $Ca_V\alpha_1$-субъединиц с $Ca_V\beta$-субъединицами, названная α_1-взаимодействующим доменом (α_1-interaction domain); P — места фосфорилирования разными протеинкиназами; PKG — цГМФ-зависимая протеинкиназа; PKA — цАМФ-зависимая протеинкиназа; PKC — протеинкиназа C

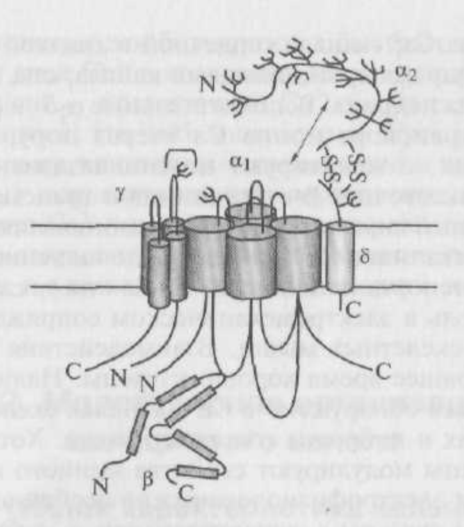


Рис. 9.2. Модель взаимодействий субъединиц потенциалуправляемого Ca^{2+}-канала. γ-Субъединица изображена как четырехтрансмембранный белок с внутриклеточными N- и C-концами. Первая половина γ-субъединицы взаимодействует с α_1-субъединицей. Первая внеклеточная петля содержит заряженные остатки и участки гликозилирования. Взаимодействующие участки $\alpha_2\delta$ и β-субъединица (β-взаимодействующий домен) с α_1-субъединицей были определены ранее

ся биофизическими и физиологическими свойствами, что может обеспечивать разнообразие клеточных ответов.

9.2.2. α_1-Субъединицы

Субъединица α_1 у млекопитающих кодируется примерно десятью определенными генами. Исторически соответствующим продуктам этих генов были даны разные номера, что иногда приводило к достаточно странным номенклатурам. В 1994 г. была принята номенклатура, в которой оригинальные изоформы α_1-субъединицы были представлены как α_{1S}, α_{1C}, α_{1D}, α_{1F}, α_{1A}, α_{1B}, α_{1E}, α_{1G}, α_{1H} и α_{1I}. В 2000 г. была принята более рациональная номенклатура на основе хорошо известной номенклатуры K^+-каналов. Ca^{2+}-каналы были классифицированы на основе двух принципов:

1) химический символ главного иона, для которого они проницаемы (в данном случае ионы Ca^{2+});

2) принцип физиологической регуляции работы канала, т. е. эти каналы потенциалуправляемые (voltage gated calcium channels) Ca^{2+}-каналы.

Это позволило ввести обозначение Ca_V. Первая цифра после этого обозначения соответствует в $Ca_V\alpha_1$-субъединице номеру ген-

ного подсемейства (от 1 до 3 в настоящее время), а вторая цифра, которая ставится после точки, соответствует порядку открытия оригинальной изоформы α_1-субъединицы внутри этого подсемей-

Таблица 9.1. **Физиологические функции и фармакология кальциевых каналов**

Канал	Ток	Локализация	Специфический антагонист	Клеточная функция
$Ca_V1.1$	L	Поперечные тубулы скелетной мышцы	Дигидропиридины, фенилалкиламины, бензотиазепины	Электромеханическое сопряжение
$Ca_V1.2$	L	Сердечные миоциты, эндокринные клетки, тела нервных клеток и проксимальные дендриты	То же	Электромеханическое сопряжение, освобождение гормонов, регуляция транскрипции, синаптическая интеграция
$Ca_V1.3$	L	Эндокринные клетки, тела нервных клеток и дендриты	»	Освобождение гормонов, регуляция транскрипции, синаптическая интеграция
$Ca_V1.4$	L	Ретина	Не установлен	Освобождение нейротрансмиттеров из палочек сетчатки и биполярных клеток
$Ca_V2.1$	P/Q	Нервные терминали и дендриты	ω-Агатоксин IVA	Освобождение нейротрансмиттеров, дендритный Ca^{2+}-транзиент
$Ca_V2.2$	N	То же	ω-CTx-GVIA	То же
$Ca_V2.3$	R	Тела нервных клеток и дендриты	SNX-482	Повторяющаяся пачечная активность
$Ca_V3.1$	T	Тела нервных клеток, дендриты, кардиомиоциты	Отсутствует	Пейсмейкерная активность, повторяющаяся пачечная активность
$Ca_V3.2$	T	То же	То же	То же
$Ca_V3.3$	T	Тела нервных клеток и дендриты	»	»

ства (от 1 до m). Соответственно этой номенклатуре Ca_V1 подсемейство (от $Ca_V1.1$ до $Ca_V1.4$) включает каналы, содержащие α_{1S}, α_{1C}, α_{1D}, и α_{1F}, для которых характерен L-тип кальциевых токов (табл. 9.1). Подсемейство Ca_V2 (от $Ca_V2.1$ до $Ca_V2.3$) включает каналы, содержащие α_{1A}, α_{1B} и α_{1E}, для которых характерны P/Q-, N- и R-типы кальциевых токов соответственно (см. табл. 9.1). Подсемейство Ca_V3 (от $Ca_V3.1$ до $Ca_V3.3$) включает каналы, содержащие α_{1G}, α_{1H} и α_{1I}, для которых характерен T-тип кальциевых токов (см. табл. 9.1).

Полная последовательность аминокислот α_1*-субъединиц* более чем на 70 % идентична внутри семейства, но α_1 -субъединицы из разных семейств гомологичны менее чем на 40 %. Это сходство семейств показано на рис. 9.3 для большинства трансмембранных доменов, формирующих пору. Разделение Ca^{2+}-каналов на три семейства (группы) филогенетически наиболее древнее, так как представители каждой группы найдены в геноме *C. Elegans*. Соответственно гены для различных α_1-субъединиц широко распространены в геноме, и даже наиболее тесно связанные члены семейства не находятся в кластерах в единичных хромосомах.

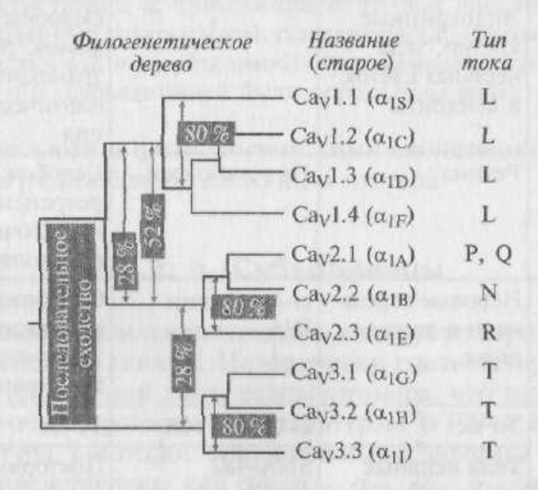


Рис. 9.3. Последовательное сходство α_1-субъединиц потенциалуправляемых Ca^{2+}-каналов. Продемонстрировано филогенетическое дерево первичных последовательностей Ca^{2+}-каналов. Сравниваются только трансмембранные сегменты и петли пор (около 350 аминокислот). В результате сравнения пар последовательностей точно определили три семейства с межсемейственными последовательностями, идентифицированными более чем на 80 % (Ca_V1, Ca_V2, Ca_V3). Далее сходство последовательности было определено для каждого семейства, и эти три последовательности были сравнены одна с другой с межсемейственными последовательностями, идентифицированными на 52 % (Ca_V1 по сравнению с Ca_V2) и 28 % (Ca_V3 по сравнению с Ca_V1 или с Ca_V2)

Человек $Ca_V1.1$ 335 GEFTKEREKAKSRGTFQKLREKQQLDEDLRGYMSWITQGEVMDVE

Мышь $Ca_V1.2$ 406 GEFSKEREKAKARGDFQKLREKQQLEEDLKGYLDWITQAEDIDPE

Крыса $Ca_V1.3$ 407 GEFSKEREKAKARGDFQKLREKQQLEEDLKGYLDWITQAEDIDPE

Человек $Ca_V1.4$ 373 GEFSKEREKAKARGDFQKQREKQQMEEDLRGYLDWITQAEELDME

Идентичные остатки у Ca^{2+}-каналов с током L-типа клеток всех известных позвоночных:

QQ--EDL-GY--WITQ-E

не **L-тип**

Крыса $Ca_V2.2$ 363 GEFAKERERVENRRAFLKLRRQQQIERELNGYMEWISKAEEVILA

Крыса $Ca_V2.2$ 357 GEFAKERERVENRRAFLKLRRQQQIERELNGYLEWIFKAEEVMLA

Крыса $Ca_V2.3$ 303 GEFAKERERVENRRAFMKLRRQQQIERELNGYRAWIDKAEEVMLA

Идентичные остатки у Ca^{2+}-каналов с током, не относящимся к L-типу, клеток всех известных позвоночных:

QQIERELNGY--WI-KAE

Рис. 9.4. Аминокислотная последовательность AID в пределах $Ca_V\alpha_1$-субъединиц. Подчеркнут α_1-взаимодействующий домен, состоящий из 18 аминокислот. Идентичные для различных типов Ca^{2+}-каналов аминокислотные остатки выделены полужирным

Молекулярная масса каждой α_1-субъединицы лежит в диапазоне от 190 до 250 кДа, при этом каждая α_1-субъединица содержит примерно 2 170 аминокислот. α_1-Субъединица представляет собой наибольшую субъединицу и формирует проводящую пору, сенсор напряжения, аппарат ворот канала и известные участки регуляции работы канала вторичными мессенджерами, лекарственными соединениями и токсинами. Подобно α-субъединицам потенциалуправляемых Na^+-каналов α_1-субъединица потенциалуправляемых Ca^{2+}-каналов организована в четыре гомологичных домена (I—IV) с шестью трансмембранными сегментами (S1—S6) в каждом. Сегмент S4 работает как сенсор напряжения. Петля поры между трансмембранными сегментами S5 и S6 в каждом домене определяет проводимость ионов и селективность; изменение только трех аминокислот в этих петлях поры в доменах I, III и IV может изменить Na^+-канал так, что он будет пропускать в основном кальций. Последние данные, полученные в этом направлении, предполагают, однако, что сенсором напряжения является комплекс S1—S4, а не только сегмент S4. Кроме того, получены данные о том, что регион поры представляет собой S5-P и P-S6. Наконец, крайне важно, что каждый из доменов играет разную роль в активации кальциевого канала. Эти вопросы будут детально рассматриваться далее.

В сердечной и гладкой мышцах α_1-субъединицы обладают небольшими различиями в NH_2-концевой группе, гидрофобных сегментах DIS6 и DIVS3 и линкере между доменами I и II в цитоплазматическом связующем участке в субъединице гладкой мышцы (см. рис. 9.1). Даже в пределах одной ткани могут существовать различные варианты $Ca_V1.2$. Недавние исследования показали, что С-концевой участок $Ca_V1.2a$ локализован вместе с «телом» α_1-субъединицы. Богатый пролином участок между остатками 1 973 и 2 001 α_1-субъединицы был идентифицирован как место связывания С-концевого участка. Поскольку карбоксильная группа подавляет активность $Ca_V1.2$-канала, канал может регулироваться изменениями связи С-концевого участка с телом α_1-субъединицы.

Первичная последовательность области связывания для всех $Ca_V\alpha_1$-субъединиц с $Ca_V\beta$-субъединицами, названная как α_1-взаимодействующий домен (α_1-interaction domain: AID), представляет собой регион из 18 аминокислот в I—II связующих участках $Ca_V\alpha_1$ субъединицы, начиная примерно от 23-й аминокислоты от конца трансмембранного сегмента S6 домена I (DIS6), который имеет фрагменты одинаковой последовательности аминокислот (рис. 9.4).

Недавние исследования показали, что AID в комплексе с $Ca_V\beta$-субъединицами формирует амфипатичную спираль. Наиболее важные аминокислотные остатки, участвующие в образовании этой спирали (Ile441, Tyr437 и Trp440), входящие в состав AID и располагающиеся на одной стороне спирали, могут заполнять комплиментарные гидрофобные полости на $Ca_V\beta$-субъединице.

9.2.3. β-Субъединицы

Четыре различных гена кодируют β-субъединицы Ca^{2+}-канала млекопитающих (β_1—β_4). Помимо этого каждая из четырех изоформ может связываться (взаимодействовать) друг с другом, демонстрируя от двух до четырех соединенных вариантов на одну β-субъединицу. β-Субъединицы имеют молекулярную массу, лежащую в диапазоне от 53 до 71 кДа. В сердечной мышце преобладает β_2-субъединица, тогда как в гладкой мышце были идентифицированы по крайней мере три различные β-субъединицы (т.е. β_{1b}, β_2 и β_3 с молекулярной массой 54—68 кДа).

В отличие от α_1-субъединицы β-субъединицы не содержат трансмембранные сегменты, хотя у них и есть гидрофобные участки. β-Субъединица плотно сцеплена с наименее изменчивой последовательностью из 18 аминокислот в цитоплазматическом связующем участке между доменами I и II α_1-субъединицы, т.е. с AID. β-Субъединица связывается через α_1-субъединицу с плазматической мембраной и увеличивает вероятность открытия и проводимость одиночных каналов (например, у $Ca_V1.2$). β_{2a}-Субъединица уникальна, поскольку она подвергается посттрансляционной модификации за счет присоединения остатка 16-углеродной пальмитиновой кислоты к остаткам цистеина β-субъединицы через тиоэфирные связи. Наличие гидрофобной насыщенной жирной кислоты облегчает встраивание и стабилизацию Ca_V1-каналов в клеточных мембранах. Поэтому предполагают, что β-субъединицы играют важную роль при транспорте Ca_V1-каналов в полярных клетках, например экспрессия определенных кальциевых каналов в нервных окончаниях, хотя не ясно, существуют ли в действительности такие субъединицы, подвергшиеся посттрансляционной модификации за счет присоединения остатка пальмитиновой кислоты в сердечных или гладкомышечных клетках. Комплекс α_2/δ состоит из внеклеточно расположенной α_2-субъединицы, связанной через дисульфидные связи с проникающей через мембрану δ-субъединицей. Белки α_2 и δ кодируются одним геном. Субъединицы α_2/δ (≈ 175 кДа) были идентифицированы в сердечной и гладкой мышцах. Эти субъединицы увеличивают Ca^{2+}-токи через канал и влияют на потенциалзависимое взаимодействие каналов с G-белками, например предотвращают предпульсовое облегчение*.

* G-белки, представляющие собой чаще всего βγ-комплекс, могут связываться с белками канала, обычно с α_1-субъединицей, что ведет к уменьшению амплитуды тока через канал. Это взаимодействие является потенциалзависимым, а именно: сильная деполяризация, например до +50 мВ (предпульс), приводит к отсоединению G-белка и увеличению амплитуды тока в течение короткого времени, пока белок опять не присоединится. Если в канале присутствует комплекс субъединиц α_2/δ, то он препятствует присоединению G-белка, т.е. усиливает ток. Доказательством того, что этот механизм опосредован G-белками, является отсутствие предпульсового облегчения.

9.2.4. γ-Субъединицы

γ-Субъединицы менее изучены. Принципы взаимодействия γ-субъединиц с субъединицами Ca^{2+}-каналов практически не известны, и их способность формировать гетерогенные комплексы остается неясной.

γ_1-Субъединица — вспомогательная субъединица с четырьмя трансмембранными областями и внутриклеточными N- и C- концевыми остатками. Роль γ-субъединицы в транспорте ионов через канал и ее взаимодействие остаются неясными. Первоначально была обнаружена γ_1-субъединица — единственная γ-субъединица, которая была связана с Ca^{2+}-каналом скелетной мышцы, однако идентификация γ_2-субъединицы у нейронов возобновила интерес к их изучению, что привело к идентификации ряда других γ-субъединиц.

9.3. Регуляция Ca^{2+}-каналов протеинкиназами

9.3.1. Регуляция Ca^{2+}-каналов посредством протеинкиназы G

Еще в 1978 г. на основании данных о том, что циклические нуклеотиды активируют процессы фосфорилирования белков клеток, было высказано предположение, что проводимость мембраны для ионов Ca^{2+} находится под контролем цАМФ и определяется активацией синтеза цАМФ аденилатциклазой и последующим фосфорилированием цАМФ-зависимыми протеинкиназами белков, связанных с Ca^{2+}-каналами. В настоящее время известно, что Ca^{2+}-каналы находятся под контролем протеинкиназ, которые фосфорилируют белки, и протеинфосфатаз, которые их дефосфорилируют, т.е. отщепляют фосфатные группы. Степень фосфорилирования белка зависит от баланса активности соответствующих протеинкиназ и протеинфосфатаз. Дальнейшие исследования показали, что фосфорилирование не меняет ни селективности, ни кинетики Ca^{2+}-каналов, а ведет к увеличению времени пребывания канала в открытом состоянии.

Клетки содержат протеинкиназы, активность которых повышается такими вторичными мессенджерами, как цГМФ (протеинкиназа G—PKG) и цАМФ (протеинкиназа A—PKA). Эти протеинкиназы называются соответственно цГМФ- и цАМФ-зависимыми. Ca^{2+}-каналы контролируются также кальмодулинзависимыми киназами (CaMK), тирозинкиназами (PTK) и протеинкиназой C (PKC). Сложность изучения влияния протеинкиназ на работу кальциевых каналов заключается в том, что протеинкиназы могут фосфорилировать различные белки, поэтому наряду с прямым дей-

ствием протеинкиназы (фосфорилирование канала этой протеинкиназой) изменение состояния канала может быть следствием цепочки событий, инициированных протеинкиназой. Несмотря на эти сложности, рассмотрим возможные механизмы регуляции каналов протеинкиназами.

Протеинкиназа G катализирует фосфорилирование множества внутриклеточных белков, которые модулируют сокращение мышц. В клетках эукариотов присутствуют два главных типа PKG: I и II. Тип I PKG — это димер, образованный двумя идентичными субъединицами. Каждая субъединица имеет массу примерно 78 кДа. Тип II PKG также существует как димер, а масса субъединицы равна примерно 86 кДа. Оба домена этой молекулы — регуляторный и каталитический — содержатся в пределах одной полипептидной цепи. Протеинкиназа G типа I широко распределена и выделена из растворимых экстрактов тканей, тогда как PKG типа II — особенная форма фермента, имеющая ограниченное распределение в ткани. Протеинкиназа G типа I присутствует в клетках и сердечных, и гладких мышц, хотя ее уровень намного больше в гладкой мышце, чем в сердечной. Схема механизма регуляции Ca^{2+}-каналов посредством PKG представлена на рис. 9.5.

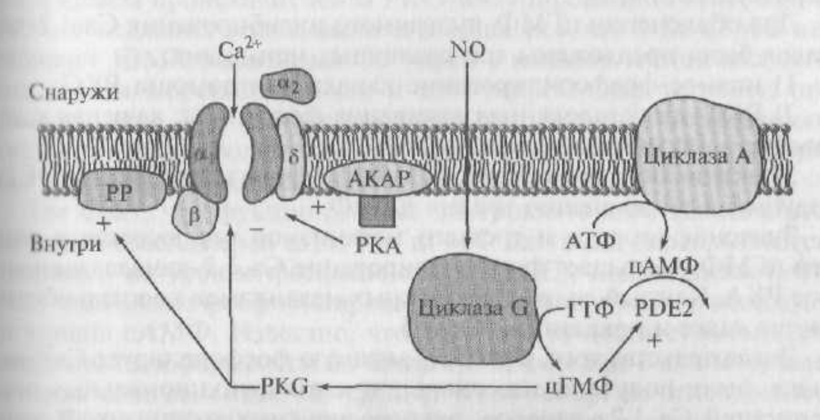


Рис. 9.5. Механизмы, предложенные для цГМФ-индуцированного ингибирования $Ca_V1.2$-канала. В этой схеме гуанилатциклаза (циклаза G) активируется окисью азота (NO), что увеличивает уровень цГМФ в клетке. Циклический ГМФ затем активирует PKG, что обеспечивает прямое фосфорилирование α_1-субъединицы Ca^{2+}-канала. Другая возможность состоит в том, что PKG активирует протеинфосфатазу (PP), которая затем дефосфорилирует канал. Наконец, цГМФ может стимулировать фосфодиэстеразу 2 (PDE2), которая уменьшает уровень цАМФ и таким образом уменьшает стимуляцию канала посредством протеинкиназы А: АКАР — белок, опосредующий взаимодействие α_1-субъединицы Ca^{2+}-канала и протеинкиназы А (A-kinase anchoring protein); циклаза А — аденилатциклаза

Доказано, что мишенью для фосфорилирования цГМФ-зависимой протеинкиназой $Ca_V1.2a$-канала является серин-533. Аналогичная мишень для PKG-фосфорилирования существует в $Ca_V1.2b$-канале (т. е. серин-528).

Механизмы регуляции Ca^{2+}-каналов посредством PKG, продемонстрированные на рис. 9.5, достаточно хорошо изучены применительно к $Ca_V1.2$-каналам и прежде всего к $Ca_V1.2a$-каналам клеток сердечной мышцы. Многочисленные данные показывают, что активация цГМФ/PKG приводит к ингибированию $Ca_V1.2a$-каналов. В некоторых случаях, однако, активация PKG приводила к увеличению амплитуды тока через $Ca_V1.2$-каналы, особенно если уровень цАМФ был повышен. В большинстве же случаев, когда наблюдалась PKG-зависимая стимуляция $Ca_V1.2a$-каналов, этот эффект определялся скорее всего непрямыми механизмами. Например, цГМФ ингибировал фосфодиэстеразу 3 (PDE3), а уменьшение активности PDE3 могло вести к увеличению уровня цАМФ и, следовательно, стимуляции Ca^{2+}-канала. Однако у вентрикулярных клеток новорожденного кролика стимулирующий эффект цГМФ на $Ca_V1.2a$-каналы был непосредственно связан с PKG, поскольку он исчезал под влиянием PKG-ингибитора KT-5823, но не PKA-ингибитора 5-22 или PDE-ингибитора IBMX.

Для объяснения цГМФ-вызванного ингибирования $Ca_V1.2$-каналов были предложены три различных механизма:

1) прямое фосфорилирование канала при помощи PKG;

2) PKG-индуцированная активация фосфатазы, ведущая к дефосфорилированию канала;

3) активация с помощью цГМФ фосфодиэстеразы 2 (PDE2), ведущей к уменьшению уровня цАМФ.

Значение второго и третьего механизмов заключается в том, что цГМФ уменьшает фосфорилирование $Ca_V1.2$-канала, вызванное PKA. Каждый из этих возможных механизмов коротко обсуждается далее и показан на рис. 9.5.

Доказательства того, что PKG впрямую фосфорилирует Ca^{2+}-каналы, были получены на основе изучения функциональных особенностей $Ca_V1.2a$-каналов, экспрессируемых в ооцитах. В этом исследовании PKG была активирована добавлением проникающего через мембрану соединения 8-бромогуанозин-3′,5′-циклический монофосфат (8-Br-цГМФ). Этот специфический циклический нуклеотид ингибировал канальные токи контрольного (wild-type) Ca^{2+}-канала. Если же остаток серина-533 в α_1-субъединице был заменен на аланин, то 8-Br-цГМФ не оказывал влияния на активность канала. Это позволяет предположить, что PKG осуществляет ингибирование путем фосфорилирования канала на серине-533. Следует также отметить, что эффект 8-Br-цГМФ не должен зависеть ни от β-субъединицы, ни от α_2/δ-субъединиц

$Ca_V1.2a$-канала, потому что ингибирование наблюдалось и в отсутствие этих субъединиц.

Уровень фосфорилирования белка зависит не только от активности киназ, но скорее от баланса между киназной и фосфатазной активностью. Таким образом, вторичные мессенджеры, влияющие на этот баланс, могут как повышать, так и понижать активность канала, чтобы удовлетворять физиологическим требованиям. Например, альтернативный механизм, с помощью которого PKG мог бы ингибировать работу Ca^{2+}-канала, может отражать увеличение активности фосфатазы, ведущей к дефосфорилированию канала. Когда ингибиторы белковой фосфатазы 1 (PP1) или 2A (PP2A) были апплицированы на сердечные миоциты, обычно наблюдалась стимуляция Ca^{2+}-каналов; это позволяет предположить, что есть и базальное (основное) фосфорилирование, и дефосфорилирование канала.

Представление, что PKG может проявить свой эффект, активируя фосфатазу, — не новое. Фосфатаза миозина гладкой мышцы является известной мишенью PKG, и активация этой фосфатазы вносит вклад в хорошо известное явление десенсибилизации миофиламентов. Кроме того, имеются данные о том, что действие цГМФ на Ca^{2+}-активируемые K^+-каналы в клетках опухоли гипофиза крысы происходит из-за PKG-индуцированной стимуляции PP2A. В недавних исследованиях сообщалось, что 8-Br-цГМФ ингибирует IBMX-вызванные Ca^{2+}-токи у каналов клеток желудочков сердца морской свинки, и этот эффект был устранен при помощи типа 1- и 2A-фосфатазного ингибитора — окадаиновой кислоты. Это позволяет сделать заключение, что PKG ингибировал каналы посредством активации фосфатазы.

Тот факт, что фукциональные внутриклеточные каскады вторичных мессенджеров цАМФ и цГМФ частично перекрываются, например на уровне фосфодиэстераз (PDE), подразумевает, что PKG-зависимое фосфорилирование Ca^{2+}-канала может зависеть и от уровня цАМФ. Известно, что в клетках существует множество различных изоферментов из числа PDE, которые были подразделены на семь семейств. По крайней мере четыре из этих семейств (т.е. PDE1—PDE4) присутствуют в сердечной мышце: PDE1 и PDE2 гидролизируют и цАМФ, и цГМФ, тогда как PDE3 и PDE4 гидролизируют только цАМФ; PDE2 стимулируется посредством цГМФ, тогда как PDE3 ингибируется посредством цГМФ, а PDE4 к ней нечувствителен. В некоторых тканях цГМФ может стимулировать $Ca_V1.2a$-канальные токи посредством ингибирования PDE3, тогда как в других тканях может ингибировать $Ca_V1.2a$-канальные токи посредством стимулирования PDE2. Этот противоположный эффект действия цГМФ на PDE2 в противоположность PDE3 продемонстрирован, чтобы подчеркнуть сложность интерпретации исследований, в которых цГМФ апплицирован к клеткам.

9.3.2. Регуляция Ca^{2+}-каналов посредством протеинкиназы А

Протеинкиназа А представляет собой тетрамер, состоящий из двух каталитических субъединиц, связанных с регуляторной субъединицей димера. Подобно PKG PKA присутствует в гладкой и сердечной мышцах. Первоначально две различные формы регуляторной субъединицы были определены, т.е. R-I и R-II, где PKA—RI-комплекс является исключительно цитозольным, а PKA—RII-комплекс полностью связан с мембраной. Современные данные, однако, выявили существенную гетерогенность в обеих — каталитической и регуляторной — субъединицах PKA. Схема механизма регуляции Ca^{2+}-каналов посредством PKA представлена на рис. 9.6.

Существуют данные, предполагающие функциональную роль *для цАМФ-зависимой протеинкиназы, фосфорилирующей в* $Ca_V1.2a$-канале серин-1928. Аналогичный PKA участок фосфорилирования существует в $Ca_V1.2b$-канале (т.е. серин-1923). Дополнительные исследования предполагают, что фосфорилирование остатков серина-478 и -479 на β_{2a}-субъединице также вовлечено в функциональное регулирование каналов с помощью PKA.

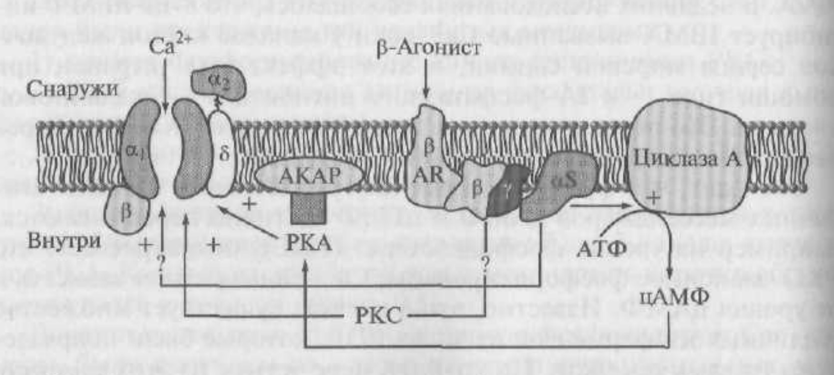


Рис. 9.6. Механизмы, предложенные для β-адренергической стимуляции $Ca_V1.2$-каналов. β-Адренергические рецепторы (β-AR) стимулируются агонистами типа изопротеренола. β-Рецептор соединен с G_s-белком, *который ведет к активации субъединиц G-белка ($G\alpha_S$ и $G\beta\gamma$). При этом* $G\alpha_S$ стимулирует циклазу А, ведя к увеличению уровней цАМФ, что активизирует PKA, локализованную в регионе $Ca_V1.2$ через AKAP. В этом случае PKA может активизировать Ca^{2+}-канал через фосфорилирование одной или больше субъединиц Ca^{2+}-канала. Напротив, $G\beta\gamma$ стимулирует PKC, возможно, через фосфатидилинозитол-3-киназу, что ведет к фосфорилированию одной или большему количеству субъединиц Ca^{2+}-канала. Наконец, существует свидетельство о прямой активации $Ca_V1.2$-канала через действие $G\alpha_S$ на канал

Механизмы регуляции Ca^{2+}-каналов посредством PKA, показанные на рис. 9.6, демонстрируются нами на примере $Ca_V1.2a$-канала. Этот канал долго рассматривался как мишень каскада рецептор — аденилатциклаза — PKA. Например, у изолированного кардиомиоцита в конфигурации whole-cell стимуляция β-адренорецепторов ведет к увеличению кальциевого тока в 3 — 7 раз посредством увеличения активности одиночного канала. По результатам недавних исследований можно предположить, что β_1-адренергические рецепторы, которые связаны исключительно с G_s-субъединицей G-белка, вызывают в большей степени широко распространяемое увеличение уровня цАМФ в клетке (т.е. диффузную активацию), тогда как β_2-адренергические рецепторы, которые могут быть соединены и с G_s-, и с G_i-субъединицами, вызывают более локальную активацию $Ca_V1.2a$-каналов.

Интерпретации ранних исследований, целью которых было определение, фосфорилируют ли PKA $Ca_V1.2$-каналы, весьма неоднозначны, поскольку большинство биохимически изолированных α_1-субъединиц подвергаются протеолитическому расщеплению, которое удаляет существенную часть COOH-терминального конца. Было показано также, что PKA-опосредованное фосфорилирование наблюдается в форме α_1-субъединицы 250 кДа, но не в обрезанной форме 200 кДа. Недавние исследования подтвердили важность COOH-терминального конца для PKA-опосредованного фосфорилирования α_1-субъединицы, более того — было определено, что серин-1928 является участком PKA-индуцированного фосфорилирования. Интересно, что хотя COOH-терминаль α_1-субъединицы и была расщеплена, авторы получили свидетельство, что «отколотая» часть α_1-субъединицы остается связанной с ее «телом» и таким образом может все еще вовлекаться в PKA-индуцированную регуляцию канала. Наряду с α_1-субъединицей сердечная β-субъединица также фосфорилируется при активации PKA; участками фосфорилирования, по-видимому, являются три свободных согласованных участка для PKA в COOH-конце.

Как показали более поздние исследования, PKA-зависимое фосфорилирование двух из трех этих участков (серин-478 и -479) существенно увеличивало кальциевый ток через канал независимо от фосфорилирования α_1-субъединицы. Интересно, что относительный вклад фосфорилирования α_1-субъединицы по сравнению с фосфорилированием β_2-субъединицы при PKA-регуляции $Ca_V1.2a$-канала in vivo может меняться при развитии клетки и/или при изменении ее внутриклеточной среды. Хотя фосфорилирование и α_1- и β_2-субъединицы приводит к увеличению тока через канал, PKA-индуцированное фосфорилирование α_1-субъединицы, по-видимому, зависит от локализации PKA вблизи канала посредством специфического белка (A-kinase anchoring protein —

AKAP) (см. рис. 9.6), тогда как фосфорилирование β_{2a}-субъединицы не требует AKAP.

Однако в другой работе РКА-индуцированное увеличение амплитуды тока в клетках НЕК-293, экспрессирующих сердечные α_1- и β_{2a}-субъединицы, не наблюдалось даже в том случае, если эти субъединицы были коэкспрессированы с AKAP79. В целом следует признать, что попытки продемонстрировать функциональную роль РКА-индуцированного фосфорилирования кальциевых каналов в экспрессированных системах привели к неоднозначным результатам.

В то время как некоторые исследователи сообщили о РКА-вызванной стимуляции $Ca_V1.2a$-токов в кардиомиоцитах, другие авторы не смогли выявить никакого эффекта РКА. Обсуждение этих противоречивых результатов привело к гипотезе о важности вспомогательных субъединиц, особенно β-субъединицы. Недавно была показана необходимость AKAP, для того чтобы канал стал мишенью РКА. Авторы одной из работ предположили, что дополнительный, но все еще не идентифицированный компонент пути важен для РКА-вызванной регуляции Ca^{2+}-канала. В основе этой точки зрения лежали данные о том, что РКА была не в состоянии стимулировать $Ca_V1.2a$-каналы до тех пор, пока в ооциты не была введена мРНК от сердечной клетки.

Еще в одном исследовании было предположено, что РКА ведет к фосфорилированию белка 700 кДа, который связан с сердечной β-субъединицей. Несмотря на работы, которые предполагают обязательную роль дополнительных регуляторных субъединиц, несколько авторов сообщили о РКА-вызванном повышении экспрессированных α_1-субъединиц $Ca_V1.2a$-канала в отсутствие других регулирующих белков. Все эти данные позволяют заключить, что и для нативных клеток, и для экспрессированных систем существуют доказательства, достаточные чтобы предположить, что РКА может стимулировать сердечные $Ca_V1.2a$-каналы посредством прямого фосфорилирования серина-1928 у α_1-субъединицы. Однако какие-либо дополнительные участки, по-видимому, должны вносить вклад в этот процесс.

Разные результаты, полученные в экспрессированных системах, могут быть связаны с различиями в используемых типах клеток, регулирующих белках, коэкспрессируемых с α_1-субъединицей, и активностью других ферментов в этих клетках (например, PDE, фосфатазы), которые модифицируют исходный уровень фосфорилирования канала. Например, в некоторых исследованиях активация РКА не оказывала влияния на работу канала, однако угнетение эндогенных РКА вызывало угнетение активности канала, предполагая тем самым, что $Ca_V1.2a$-каналы уже были максимально фосфорилированы в исходных условиях.

9.3.3. Регуляция Ca^{2+}-каналов посредством протеинкиназы С

Одиннадцать изоформ протеинкиназы С, идентифицированные в тканях млекопитающих, разделены на три группы:

1) классические или обычные РКС (сРКС), которые активируются диацилглицеролом или форболовыми эфирами и являются Ca^{2+}-зависимыми (включая α, βI, βII, γ);

2) новые РКС (nРКС), которые активируются диацилглицеролом или форболовыми эфирами и являются Ca^{2+}-независимыми (δ, ε, θ, η, L, μ);

3) атипичные РКС (аРКС), которые не активируются диацилглицеролом, форболовыми эфирами или Ca^{2+}(λ/ι, ζ).

Схема механизма регуляции Ca^{2+}-каналов посредством РКС представлена на рис. 9.7.

Хотя примерно 18 потенциальных протеинкиназ С фосфорилируют участки, существующие на α_1-субъединице, до настоящего времени нет данных, четко идентифицирующих роль для этих участков в активации канала. Однако недавние работы позволяют полагать, что треонин-27 и -31 в $Ca_V1.2a$-канале вовлечены в

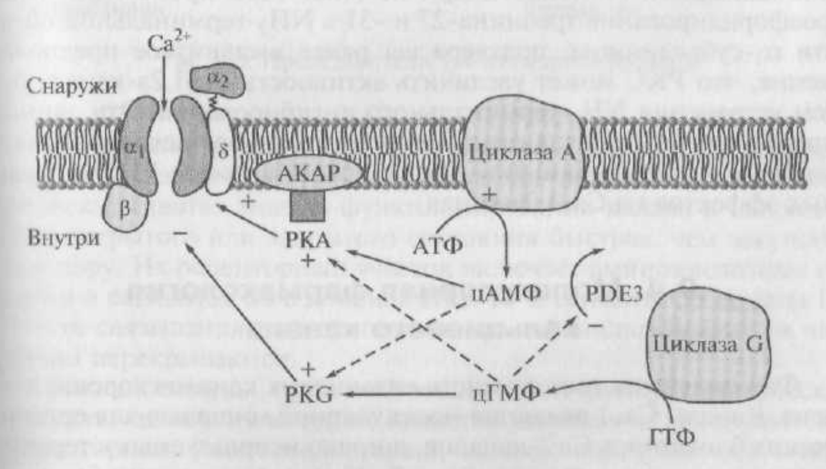


Рис. 9.7. Механизмы, предложенные для цГМФ-стимуляции и цАМФ-ингибирования $Ca_V1.2$-каналов (пунктирные стрелки). Cross-talk между циклическими нуклеотидами может вести к цАМФ-индуцированной активации PKG, что ингибирует канал, или цГМФ-индуцированной активации РКА, что стимулирует канал. Cross talk, более вероятно, происходит тогда, когда в клетке достигаются более высокие уровни циклических нуклеотидов. Наконец, было также сообщено, что цГМФ ингибирует PDE3, который ведет к увеличению уровня цАМФ и, следовательно, стимуляции канала через РКА

PKC-индуцированное ингибирование канала. Эти участки не присутствуют на $Ca_V1.2b$.

Протеинкиназа С фосфорилирует различные белки и среди них — $Ca_V1.2a$-канал. Обе субъединицы — α_1 и β_2 — фосфорилируются PKC in vitro со стехиометрией 2—3 моля фосфата на 1 моль α_1-субъединицы и 1—2 моля фосфата на 1 моль β_{2a}-субъединицы.

Результаты исследований действия PKC на кальциевые каналы остаются противоречивыми. Некоторые исследователи нативных клеток показали PKC-обусловленную стимуляцию $Ca_V1.2a$-каналов, тогда как другие авторы сообщили об их ингибировании. Было также показано, что стимуляция кальциевых токов форболовыми эфирами, которые прямо активируют PKC, в ряде случаев была проходящей (кратковременной) и сопровождалась более поздним ингибированием тока с последующим PKC-независимым эффектом. Кроме того, имеются предварительные данные в том, что различные изоформы PKC могут вызвать противоположное действие на $Ca_V1.2a$-канал. Например, cPKC вызывает ингибирование $Ca_V1.2a$-канала, в то время как nPKC увеличивает кальциевый ток.

Исследования, проведенные на Ca^{2+}-каналах, экспрессированных (встроенных) в TSA-201-клетки, показали, что ингибирование канальной активности при помощи PKC происходит через фосфорилирование треонина-27 и -31 в NH_2-терминальной области α_1-субъединицы, подтверждая ранее выдвинутое предположение, что PKC может увеличить активность $Ca_V1.2a$-канала путем устранения NH_2-терминального ингибирования. Эти данные предполагают необходимость дополнительных исследований, чтобы выяснить механизмы комплексной природы PKC-вызванных эффектов на $Ca_V1.2a$-канал.

9.4. Молекулярная фармакология кальциевого канала

Фармакология трех семейств кальциевых каналов хорошо изучена. Каналы Ca_V1 являются молекулярной мишенью для органических блокаторов Ca^{2+}-каналов, широко используемых в терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Как полагают, эти вещества действуют на три отдельные, но аллостерически связанные рецепторные участки.

Фенилалкиламины представляют собой блокаторы внутриклеточного участка поры. Полагают, что эти вещества входят в пору из цитоплазматических участков канала и блокируют их. Их рецепторные участки образованы аминокислотными остатками в сегментах S6 в доменах III и IV по аналогии с рецепторным участком для анестетиков у Na^+-каналов.

Нифедипин

Никадипин

Нисолдипин

Амлодипин

Нимодипин

Фелодипин

Рис. 9.8. Представители 1,4-дигидропиридинов

Дигидропиридины могут быть активаторами или ингибиторами Ca^{2+}-каналов (рис. 9.8). Полагают, что они действуют аллостерически, сдвигая модуль функционирования канала в направлении открытого или закрытого состояния быстрее, чем закупоривая пору. Их рецепторный участок включает аминокислотные остатки в сегментах S6 в доменах III и IV и сегменте S5 домена III. Места связывания дигидропиридинов и фенилалкиламинов частично перекрываются.

Бензодиазепины, представляющие собой группу синтетических веществ, одним из которых является дилтиазем, связываются с рецепторным участком, который, однако, перекрывается с местом связывания фенилалкиламинов (рис. 9.9).

Семья Ca_V2 относительно нечувствительна к дигидропиридиновым блокаторам Ca^{2+}-каналов, но специфически блокируется пептидными токсинами пауков и морских улиток. $Ca_V2.1$-каналы блокируются специфическим ω-агатоксином IVA яда из паутины паука. $Ca_V2.2$-каналы блокируются специфически ω-конотоксином GVIA, сопоставимым с токсинами улиток. $Ca_V2.3$-каналы блокируются специфически пептидным токсином SNX-482, выделенным из яда тарантулов. Эти пептидные токсины могут быть потен-

OCH3 · HCl S OCOCH3 N O CO2CH2N(CH3)2

Рис. 9.9. Представитель бензодиазепинов дилтиазем

циальными блокаторами синаптической передачи, потому что их специфические эффекты реализуются через Ca_V2-семью Ca^{2+}-каналов.

Семья Ca_V3 нечувствительна к обоим дигидропиридинам, которые блокируют Ca_V1-каналы, и токсину паука или токсину конусной улитки, которые блокируют Ca_V2-каналы. Специфические блокаторы Ca_V3-каналов пока не найдены. Органический блокатор Ca^{2+}-каналов мибефрадил в какой-то степени специфичен для Ca_V3 по сравнению с Ca_V1 Ca^{2+}-токов (в 3—5 раз). Пептид куртоксин ингибирует активационные ворота $Ca_V3.1$- и $Ca_V3.2$-каналов. Развитие более специфических и высокоаффинных блокаторов Ca_V3-семьи Ca^{2+}-каналов должно быть полезным для терапии и для более детального анализа физиологической роли этих каналов.

9.5. Анализ селективной проницаемости каналов

9.5.1. Мультиионные основы селективной проницаемости в Ca^{2+}-каналах

Считается, что селективный фильтр ионного канала ведет себя как аналог водной среды, стабилизируя ионы, так же как вода стабилизирует их в растворе. В Ca^{2+}-каналах ионы Ca^{2+} так или иначе более эффективно стабилизированы, чем ионы Na^+. Это простое описание селективности Ca^{2+}-канала на основе стабилизации в нем ионов Ca^{2+} вылилось в первую очередь в структурно-функциональный анализ ионного канала. Два наиболее важных предположения, которые появились в течение раннего периода исследований Ca^{2+}-канала, заключаются в следующем:

1) Ca^{2+}-каналы выбирают ионы на основе сродства;

2) поток ионов через Ca^{2+}-каналы — это мультиионный процесс.

Данные, подтверждающие эти гипотезы, были получены непосредственно на природных (естественных) Ca^{2+}-каналах в экспериментах на различных видах клеток беспозвоночных и позвоночных. Все типы каналов обладают селективной проницаемостью, но поскольку дигидропиридинчувствительные Ca_V1-каналы, обнаруженные в скелетной мышце, сердце и мозге, были клонированы первыми, дальнейшее структурно-функциональное изучение сконцентрировалось именно на этих каналах. По этой причине в основу представлений, изложенных в настоящем обзоре,

положены данные, полученные главным образом на Ca_V1-каналах позвоночных.

Селективность на основе аффинности. Простое молекулярное отсеивание препятствует проходу через селективный фильтр Ca^{2+}-каналов катионов, бо́льших, чем тетраметиламмоний. Однако отсеивание не может объяснять способность Ca^{2+}-каналов различать ионы Ca^{2+} и Na^+, имеющие одинаковые размеры. Вместе с тем модельные расчеты показывают, что сила взаимодействия между белками Ca^{2+}-каналов и катионами определяет проводимость этих катионов. Селективность Ca^{2+}-канала могла бы определиться специфическим местом связывания иона Ca^{2+}. Такой механизм был предположен, исходя из следующих наблюдений. Во-первых, Ca^{2+} уменьшал амплитуду и скорость нарастания потенциалов действия, вызванных потоком ионов Sr^{2+} через Ca^{2+}-каналы, как если бы Ca^{2+} блокировал Sr^{2+}-ток, конкурируя со Sr^{2+} за места связывания в канале. Во-вторых, хотя Ca^{2+}-ток через канал меньше, чем Ba^{2+}-ток, было показано, что Co^{2+} блокирует Ca^{2+}-ток через Ca^{2+}-каналы менее выраженно, чем Ba^{2+}-ток через те же Ca^{2+}-каналы. Интерпретация этих результатов заключалась в том, что Ca^{2+} в поре связывается более сильно, чем Ba^{2+}, и благодаря этому Ca^{2+} имеет более медленную скорость проникания через пору и меньшую чувствительность к блокированию ионами Co^{2+}.

Кроме ионов Ca^{2+} двухвалентные катионы Ba^{2+} и Sr^{2+} могут легко проходить через Ca^{2+}-каналы. В отсутствие Ca^{2+} или других проникающих через канал двухвалентных катионов маленькие катионы металлов типа Li^+, Na^+, K^+ и Cs^+ могут также легко проходить через пору Ca^{2+}-канала. Даже катионы металлов, которые блокируют Ca^{2+}-каналы, включая Cd^{2+}, Co^{2+} и La^{3+}, проходят через канал, хотя настолько медленно, что ток исчезающе малой величины, который они несут, не обнаруживается. Высокая аффинность этих блокаторов для места связывания внутри поры приводит к медленной скорости их отсоединения и, следовательно, к блоку канала.

Относительная проницаемость Ca^{2+}-канала для двухвалентных и моновалентных катионов была определена путем измерения биионного потенциала реверсии. Была показана следующая последовательность проницаемости: $Ca^{2+} > Ba^{2+} > Li^+ > Na^+ > K^+ > Cs^+$. Селективность для ионов Ca^{2+} по сравнению с ионами Na^+ более чем 1 000 : 1, и это объясняет тот факт, что Ca^{2+}-ток является крайне малочувствительным к концентрации внеклеточного Na^+. Для $Ca_V2.2$-каналов, которые, так же как и Ca_V1-каналы, имеют в поре высокоаффинное место связывания Ca^{2+}, было показано, что физиологические уровни концентрации внеклеточного Na^+ уменьшают двухвалентный ток в соответствии с предположением, что ионы Na^+ конкурируют с ионами Ca^{2+} за вход в пору, уже занятую ионом Ca^{2+}. Упорядоченная относительная проницаемость

для моновалентных катионов и для двухвалентных катионов предполагает, что селективность отражает равновесие между ионной дегидратацией и энергией связывания. Относительная проницаемость, рассчитанная с учетом измерений потенциала реверсии, следовательно, согласуется с тем, что селективность Ca^{2+}-канала обеспечивается связыванием иона, но не доказывает это.

Измерение проводимости одиночного канала дает альтернативную оценку проницаемости для определенного иона, т.е. показывает, как быстро проницаемые ионы пересекают пору. Измеренная последовательность значений проводимости ионов для Ca^{2+}-каналов соответствует следующему порядку: $Ca^{2+} < Ba^{2+} < Li^{+} < Na^{+} < K^{+} < Cs^{+}$. Это означает, что ионы Ca^{2+} проходят через пору с более низкой скоростью, чем это делают, например, ионы Na^{+}. Это можно объяснять связыванием иона в поре, так что ионы, обладающие большим сродством к селективному фильтру, проходят через пору более медленно. Такая гипотеза «липкой поры» предсказывает также порядок селективности, полученный на основе измерений потенциала реверсии Ca^{2+}-канала. Ионы, которые связываются более сильно (Ca^{2+}), обладают высокой селективностью, но имеют низкую проводимость, в то время как ионы, связывающиеся менее сильно (Na^{+}), имеют низкую селективность, но высокую проводимость.

Эта точка зрения позволяет описывать прохождение Ca^{2+} через канал, основываясь на механистическом представлении поры как электростатического поля. Взаимодействие иона Ca^{2+} и электростатического поля можно тогда представить при помощи диаграмм энергетических профилей*.

Как показано на основании оценки кинетики блока канала, скорости входа и выхода Ca^{2+} отличаются между различными уровнями проводимости, и эти различия скорости могут быть включены в теорию скоростей реакции, чтобы предсказать амплитуды энергетических барьеров/ям.

Мультиионная пора. В случае, если ионы проходят через канал один за одним, т.е. только один ион находится в поре в каждый момент времени, селективность, опосредованная аффинностью, неэффективна. В этом случае ион, который связывается в поре более эффективно, проходит через канал медленнее (в 1 000 раз) и в это же время он блокирует вход других ионов. Таким образом, чем больше различие в аффинности у ионов, тем более эффек-

* Проводимость ионных каналов часто характеризуется при помощи диаграмм их энергетических профилей. Эти диаграммы строятся на основе теории скоростей реакции, которая представляет собой в модифицированном разными авторами виде теорию абсолютных скоростей реакции Эйринга. При движении иона через канал рассматривается последовательность реакций связывания иона в энергетических ямах, разделенных энергетическими барьерами, через которые последовательно продвигается ион.

тивно ион, обладающий высокой аффинностью, блокирует вход ионов с более низкой аффинностью. По той же причине ток, опосредованный высокоаффинными ионами, всегда будет меньше тока, вызванного ионами с более низким сродством. Мультиионные поры, т.е. поры, в которых находится несколько ионов в каждый момент времени, могут преодолевать это ограничение вследствие ионионного взаимодействия внутри поры. В этой ситуации один ион с высокой аффинностью отталкивает и, следовательно, проталкивает другой, ускоряя таким образом поток ионов при сохранении высокой селективности. Доказательства, что Ca^{2+}-каналы функционируют по механизму мультиионной поры, весомы и будут обсуждены далее.

Если во внеклеточном растворе находится только один сорт ионов, то *для Ca_V1-каналов проводимость для Ba^{2+} больше*, чем для Ca^{2+} в растворе с эквимолярной концентрацией, но в смеси ионов Ba^{2+} и Ca^{2+} с общей концентрацией двухвалентных ионов — такой же, как для растворов только Ba^{2+} или только Ca^{2+}, проводимость может быть меньше, чем в растворе только одного Ba^{2+} или только одного Ca^{2+}. Это явление более выражено для смесей ионов Ca^{2+} и Na^{+}. Такое аномальное мольфракционное поведение было сначала описано для ионселективных стекол, впоследствии было показано для пор, сформированных антибиотиком грамицидином, и для K^{+}-каналов, а затем было обнаружено во многих видах других ионных каналов. Моделирование процесса в целом проводили на основе предположения, что пора содержит несколько мест связывания и что перемещение ионов от места к месту проходит последовательно (in single file). Аномальное мольфракционное поведение обнаруживается не при всех экспериментальных условиях, но это несомненно происходит в одиночных Ca^{2+}-каналах. Даже когда аномальное мольфракционное поведение не наблюдается, зависимость проводимости одиночного канала от концентрации проникающего иона не может быть приемлемо описано с помощью модели, предполагающей одно место связывания. Скорее следует предположить наличие трех мест связывания.

Возможно, наиболее существенным доказательством того, что пора Ca^{2+}-канала является мультиионной, было определение двух констант диссоциации для ионов Ca^{2+}. Первая K_d, равная 1 мкмоль/л, была измерена при блоке ионами Ca^{2+}-тока, опосредованного ионами Na^{+}. Вторая K_d, равная 14 ммоль/л, была измерена в условиях насыщения тока через одиночный канал. Таким образом, Ca^{2+}-каналы демонстрируют две различные аффинности для Ca^{2+}. Два значения аффинности для ионов Ca^{2+} у канала могут быть постулированы, если представить себе, что канал обладает двумя Ca^{2+}-связывающими местами. Эти места связывания, как часто обсуждается в литературе, расположены в поре, но не исключается возможность, что одно место связывания находится в поре, а дру-

гое, — на выступающей в раствор поверхности белка. Ключевой момент, однако, заключается в том, что пора с двумя местами связывания может эффективно связывать оба иона — и Ca^{2+}, и Na^{+}, но при этом селективность больше для ионов Ca^{2+}, и это позволяет ионам Ca^{2+} быстро проходить через пору. Этот принцип работает, потому что Ca^{2+} более эффективно, чем Na^{+}, связывается с тем или иным местом и, таким образом, блокирует поток ионов Na^{+} через пору. Однако если оба места заняты ионами Ca^{2+}, то электростатическое отталкивание между двумя двухвалентными катионами преодолевает плотное связывание иона Ca^{2+} с селективным фильтром и позволяет одному из ионов Ca^{2+} выходить из поры быстрее. Это разрешает очевидный парадокс, что отсоединение Ca^{2+} от высокоаффинного места связывания происходило бы слишком медленно, чтобы поддерживать большой ток через одиночный канал, наблюдаемый для Ca^{2+}-канала.

Наиболее убедительные доказательства того, что в Ca^{2+}-каналах могут находиться по крайней мере два двухвалентных катиона, получены на основе изучения кинетики блока ионами Cd^{2+} Ba^{2+}-тока, текущего через одиночный Ca^{2+}-канал. Зависимость скорости отсоединения Cd^{2+} от длительности моментов блокирования показывает, что повышение концентрации Ba^{2+} увеличивает скорость отсоединения Cd^{2+}. Другими словами, увеличение вероятности того, что ион Ba^{2+} находится в поре одновременно с блокирующим ионом Cd^{2+}, уменьшает время, в течение которого Cd^{2+} связывается в поре. Ba^{2+}-зависимое повышение скорости выхода из поры Cd^{2+} подтверждает предположение, что взаимодействие между парами ионов Ca^{2+} лежит в основе быстрого Ca^{2+}-потока через высокоаффинную пору.

Однако взаимодействие между ионными парами в пределах поры не обязательно требует присутствия двух высокоаффинных мест связывания. Из результатов анализа кинетики блока одиночного канала следует, что высокоаффинное связывание происходит только около экстрацеллюлярного конца поры Ca^{2+}-канала, т.е. так, как будто имеется всего лишь одно место для высокоаффинного связывания. В сходных работах были представлены доказательства того, что низкоаффинные места связывания, располагающиеся сбоку высокоаффинного места, также могут влиять на силу связывания высокоаффинного места. Известны и другие модели поры с одиночным высокоаффинным местом связывания.

Объединение теорий связывания и взаимодействия ионов в Ca^{2+}-каналах дают следующее представление. Пора Ca^{2+}-канала широкая и без труда пропускает некоторые двухвалентные и одновалентные катионы металлов. Для смеси этих ионов аффинность связывания в пределах поры определяет, какой из ионов будет селективно проникать через этот канал. Ионы, обладающие большой аффинностью, блокируют поток низкоаффинных ионов. От-

ришательное электростатическое взаимодействие между парами проникающих двухвалентных катионов в пределах поры позволяет привилегированным ионам типа Ca^{2+} быстро выходить из поры. Это представление было поддержано параллельным изучением K^+-каналов, для которых впервые была выдвинута гипотеза длинной поры с несколькими местами связывания.

Исследования показали, что проникающий ион (K^+) может усиливать отсоединение медленно проникающего блокирующего иона (Ba^{2+}), и продемонстрировали, что физиологически проникающий ион (K^+) может блокировать поток обычно не проницаемого иона (Na^+). Рентгенокристаллография структуры K^+-канала впрямую показала, что K^+-каналы обладают мультиионными порами. Результаты ядерного магнитного резонанса показали, что грамицидин представляет собой соединение, также формирующее мультиионнный канал.

9.5.2. Молекулярная организация селективного фильтра

Клонирование Ca_V1-каналов клеток скелетной и сердечной мышц являлось первым шагом в направлении структурно-функционального анализа селективной проводимости Ca^{2+}-каналов. Анализ гидрофобных свойств предсказанной аминокислотной последовательности продемонстрировал организацию пересекающих мембрану доменов, подобных таковым у потенциалуправляемых Na^+- и K^+-каналов с четырьмя предполагаемыми Р-петлями стенки поры (pore-lining P-loops) (рис. 9.10 и рис. 9.11). Эти данные выводят исследования на принципиально новую стадию анализа функции поры с помощью метода точечного мутагенеза (замещения одного нуклеотида в одном месте в генетической последовательности).

Например, сравнение последовательностей аминокислот у родственных по структуре K^+-каналов привело к открытию мутации Р-петли K^+-канала, в результате которой ионная селективность К-канала изменилась так, что проявилась функциональная связь между K^+-каналами и каналами, чувствительными к циклическим нуклеотидам (cyclic nucleotide-gated channels). Подобным образом вызванная мутация поры Na^+-канала приводит к появлению у него проницаемости, подобной проницаемости Ca^{2+}-канала. Замена аминокислотных остатков лизина и аланина на глутамат привела к образованию мутанта Na^+-канала, который блокировался микромолярными концентрациями Ca^{2+} и был селективен для Ca^{2+}. Такое доказательство функциональных связей, сочетаемых с эволюционными отношениями между членами суперсемейства потенциалуправляемых ионных каналов, подразумевало, что те или

Внешняя среда

DI DII DIII DIV

P

S1 S2 S3 S4 S5 S6

$-NH_2$

Внутренняя среда

–COOH

а

Внешняя среда

P-I P-II P-III P-IV

F D N F A F A M L T V F Q C I T M E G W T

F D N F P Q S L L T V F Q I L T G E D W N

F D N V L A A M M A L F T V S T F E G W P

F Q T F P Q A V L L L F R C A T G E A W Q

393 736 1145 1146

2 1 0 –1 –2

Внутренняя среда

б

Рис. 9.10. Мембранная топология и аминокислотные последовательности, которые формируют часть выстилки поры для L-типа Ca^{2+}-канала кардиомиоцита:

а — домены; *б* — Р-петли; в каждой из четырех петель, входящих в состав поры, глутамат EEEE-локуса обозначен как нуль (0); номера остатков глутамата (образующих EEEE-локус) в аминокислотной последовательности представлены слева от каждого

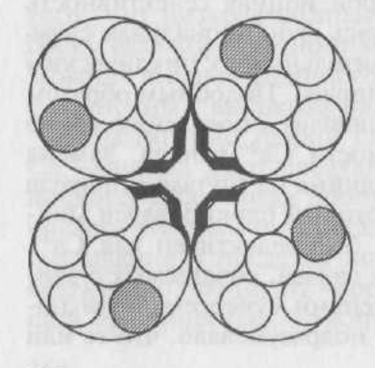


Рис. 9.11. Стилизованное представление о Ca^{2+}-канале с внеклеточной стороны. Четыре Р-петли формируют центральную пору, а сегменты S4 образуют белковые поверхности канала, контактирующие с липидами мембраны, по аналогии со структурой бактериального K^+-канала. Внутриклеточные и внеклеточные петли, соединяющие домены и сегменты, не показаны

нные находки для одного канала значительно влияют на теоретическую оценку нюансов работы других каналов — членов суперсемейства.

Исследователи рассматривали последовательности Р-петли в качестве вероятных мест связывания и на основе преобладающих моделей с двумя местами связывания искали кандидатов для двух независимых мест связывания. Поскольку каждая структура K^+-канала также селективна, как и у Ca^{2+}-канала, то можно полагать, что аминокислотные остатки Ca^{2+}-канала не более электроотрицательны, чем в полярных группах K^+-канала; следовательно, кластеры полярных участков должны работать и в Ca^{2+}-каналах. Наиболее вероятным кандидатом места связывания Ca^{2+} был кластер, состоящий из четырех глутаматных остатков (см. рис. 9.10, позиции 0), названный ЕЕЕЕ-локусом. Эти глутаматные остатки, один в каждой из четырех Р-петель Ca^{2+}-каналов, располагаются под прямым углом к основной цепи аминокислот белка, образующего Ca^{2+}-канал. Несколько лабораторий одновременно сообщили информацию, касающуюся эффектов одиночных точечных мутаций в ЕЕЕЕ-локусе. В этом случае селективность мутантных каналов была серьезно нарушена. Биионные потенциалы реверсии показали, что относительная проницаемость Ca^{2+} была уменьшена, а эксперименты с блокированием показали, что аффинность для Ca^{2+} была также уменьшена. Все эти эксперименты доказывают, что ЕЕЕЕ-локус необходим для Ca^{2+}-селективности.

Ограничение региона высокоаффинного связывания Ca^{2+}. Среди тестируемых Ca^{2+}-каналов с точечными мутациями замены глютамата в ЕЕЕЕ-локусе на аспартат или глутамин уменьшили Ca^{2+}-связывающую аффинность примерно в 20 раз. Как такое может быть, если пора имеет не один, а два связывающих участка, каждый из которых, по-видимому, связывает Ca^{2+} с высокой (~ 1 мкмоль/л) аффинностью? Этот вопрос инициировал изучение другого вопроса: представляет ли ЕЕЕЕ-локус единственную область высокоаффинного взаимодействия с Ca^{2+}? Определенные эксперименты были выполнены с использованием конструкции, в который ЕЕЕЕ-локус был заменен четырьмя глутаминовыми или четырьмя аланиновыми остатками. В этих мутантных каналах, не имеющих типичного ЕЕЕЕ-локуса, Ca^{2+} блокировал одновалентный ток с определенной аффинностью около 1 ммоль/л. Такое низкоаффинное взаимодействие не имело бы никакого влияния на взаимодействие ион—ион в поре, поэтому было сделано заключение, что высокоаффинное взаимодействие с Ca^{2+} — причина селективной проницаемости Ca^{2+}-каналов — происходит исключительно в пределах ЕЕЕЕ-локуса.

Однако двухвалентные катионы неспособны генерировать токи измеримой величины через пору мутантных каналов, в которой ЕЕЕЕ-локус образован четырьмя аланиновыми или четырьмя глу-

таминовыми остатками. Если основываться на общепринятом представлении, что EEEE-локус расположен около внеклеточного входа поры, то ион Ca^{2+}, пытающийся пройти через эту пору, должен был бы пересечь у мутантных пор AAAA- или *QQQQ*-локус, заменяющий EEEE-локус, перед тем как он достигнет второго предполагаемого высокоаффинного места связывания. Однако поскольку Ca^{2+} не может легко (или совсем не может) пройти через пору с замененным EEEE-локусом, возможно, он никогда не достигнет второго места, поэтому такие мутанты не позволяют судить о наличии или отсутствии второго места, опираясь на результаты блокирования одновалентного тока в этих мутантных каналах.

Согласно предположению вход ионов Ca^{2+} через противоположное (внутриклеточное) отверстие поры может блокировать одновалентный ток. Эксперименты на изолированных участках мембраны (inside-out excised patches) не привели к обнаружению второго высокоаффинного участка связывания Ca^{2+}, так как не был выявлен высокоаффинный блок, который получался бы при входе Ca^{2+} из внутриклеточной стороны. Очевидно, высокоаффинное взаимодействие с Ca^{2+} происходит в пределах только EEEE-локуса.

Один локус для высокоаффинного связывания Ca^{2+}. Если никакого высокоаффинного места связывания Ca^{2+} вне EEEE-локуса не существует, тогда возникает вопрос: должен ли сам EEEE-локус образовывать два места связывания? Иначе говоря, мог бы EEEE-локус быть составленным из двух отдельных пар глутаматов (EE и EE), причем каждая из пар должна формировать одно высокоаффинное место связывания?

Можно предположить, что локус, организованный таким образом, может связать два иона Ca^{2+}, чтобы полностью нейтрализовать заряд на четырех глутаматах. Чтобы проверить эту точку зрения, были проведены исследования аффинности связывания Ca^{2+} EEEE-локусом, используя двойные аланиновые мутанты (EE и AA). Так как неизвестно, какая из глутаматных пар могла бы формировать предполагаемые два места высокой аффинности, пары аланиновых замен в EEEE-локусе были представлены согласно шести различным вариантам, на основе которых эти четыре глутамата могли бы быть спарены (1—2; 1—3; 1—4; 2—3; 2—4; 3—4). Если две глутаматных пары формируют два высокоаффинных участка для Ca^{2+}, то две из шести двойных замен, как ожидалось бы, оставят одно место или другое место неповрежденным. Однако, как было показано, каждая из шести двойных аланиновых замен уменьшала аффинность к Ca^{2+} почти в *100* раз. *Ни* одна из остающихся пар EE не сохранила высокую аффинность, ожидаемую согласно этой гипотезе.

Было показано, что даже единичные точечные мутации в EEEE-локусе существенно ослабляют связывание Ca^{2+} — пример-

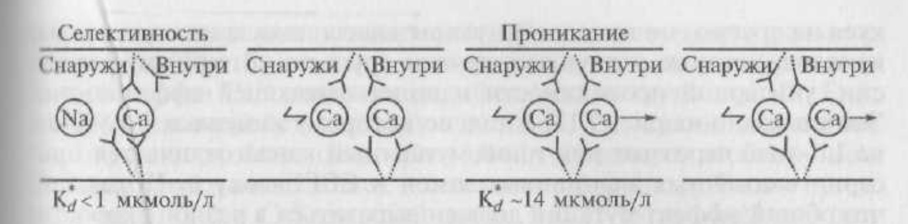


Рис. 9.12. Причудливое описание вероятной структурной гибкости в ЕЕЕЕ-локусе. Глутаматные цепи на каждой стороне изображены в виде вилок

но в 50 раз для единичных аланиновых замен. Поскольку блок одновалентного потока отражает присутствие только одного иона Ca^{2+} в поре и замена любого из глутаматов в ЕЕЕЕ-локусе уменьшает аффинность к Ca^{2+}, очевидно, что каждый из четырех глутаматных остатков участвует в связывании одного иона Ca^{2+}. Таким образом, было постулировано, что все четыре глутамата требуются для высокоаффинного связывания, и, по-видимому, все они формируют единственное высокоаффинное место.

В таком случае возникает вопрос: как увязать идею только одного высокоаффинного места с достаточно жесткими доказательствами того, что Ca^{2+}-каналы представляют собой мультиионные поры? Чтобы встроить эту концепцию в структурную модель, предложили, что ЕЕЕЕ-локус может быть физически гибким. В достаточно специфической точке зрения, проиллюстрированной на рис. 9.12, все четыре глутамата необходимы, чтобы удерживать один ион Ca^{2+}, но эта конформация может быстро перестроиться, возможно, через ряд очень короткоживущих промежуточных звеньев, чтобы разместить пару ионов Ca^{2+} в пределах локуса, причем оба иона связываются, скорее всего, слабо (основа высокой унитарной проводимости). Хотя схематичное поведение поры (см. рис. 9.15) является весьма гипотетичным, рентгенкристаллографические изображения K^+-каналов обеспечили представление о возможности такого поведения. Возможно, что проникающий ион может входить в пору, содержащую уже два иона, подталкивая один из оккупирующих ионов наружу.

9.5.3. Функциональная асимметрия среди глутаматов селективного фильтра

Наиболее интересные данные, полученные в экспериментах с мутантными ЕЕЕЕ-локусами, заключались в том, что отдельные глутаматы, составляющие ЕЕЕЕ-локус, оказались неэквивалентными. Замена одной и той же аминокислоты в позиции ЕЕЕЕ-ло-

куса на другую, но гомологичную вызывала появление мутантных каналов, которые отличались друг от друга по потенциалу реверсии, унитарной проводимости и ионсвязывающей аффинности. Это показано на рис. 9.13, согласно которому кинетика Cd^{2+}-блока Li^{+}-тока через тот или иной мутантный канал отличается при серии единичных аланиновых замен в ЕЕЕЕ-локусе. Показано, что общий эффект мутаций должен выразиться в разной скорости развития Cd^{2+}-блока Li^{+}-тока. Для других сравниваемых пар ионов (например, Cd^{2+} по сравнению с Ba^{2+}) было замечено повышение скорости развития блока. Наибольшее изменение в кинетике развития блока наблюдалось при замене глутамата в домене III (E_{III}); как было установлено, замена в этом положении вызывает наиболее сильный эффект. Экспериментальные результаты показывают, что наиболее важным является домен E_{III}, затем E_{II}, тогда как E_{I} и E_{IV} играют менее важную роль.

Значение функциональной неэквивалентности среди глутаматов ЕЕЕЕ-локуса неизвестно. Предполагают, что это является кри-

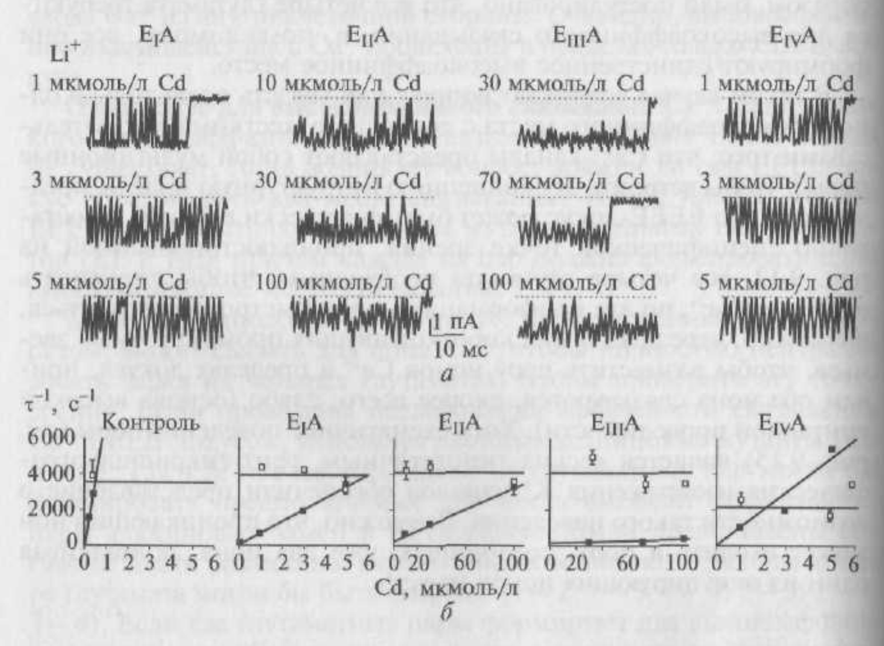


Рис. 9.13. Мутанты с единичным аланином в ЕЕЕЕ-локусе различаются между собой по кинетике Cd^{2+}-блока:

а — токи через единичный канал, которые переносятся Li^{+}; пунктирные линии указывают закрытое состояние. Замененный глутамат обозначен номером домена (римские цифры); *б* — графики демонстрируют концентрационно-зависимый блок Cd^{2+} ($1/\tau_{open}$) и деблокирование ($1/\tau_{shut}$). Линии указывают константы связывания (on-rate) (k_{on}, заполненные символы) и отсоединения (off-rate) Cd^{2+} (k_{off}, открытые символы)

тически важным для потока ионов. По-видимому, центральные глутаматы (E_{III}, E_{II}) сильно взаимодействуют с единичным связанным ионом Ca^{2+}, тогда как периферические глутаматы (E_I, E_{IV}), которые взаимодействуют менее сильно с уже связанным ионом Ca^{2+} и имеют возможность найти нового партнера, особенно ион Ca^{2+}, который заново вошел в селективный фильтр. Таким путем вход иона Ca^{2+} в Ca^{2+}-занятый локус может быть облегчен, при этом одновременно облегчен выход иона Ca^{2+}, который предварительно был связан. Согласно этой гипотезе общий эффект конкуренции для неэквивалентно связывающих глутаматов заключается в обеспечении генерации большого потока Ca^{2+} через высокоаффинный селективный фильтр (см. рис. 9.13).

Функциональные различия между глутаматами ЕЕЕЕ-локуса должны определяться структурой канала, но в отсутствие знания о детальной структуре канала внимание обязательно фокусируется на аминокислотных остатках в соседних позициях в последовательности полипептида.

9.5.4. Функциональные группы, которые связывают Ca^{2+} в селективном фильтре

С тех пор как ЕЕЕЕ-локус был обнаружен, наиболее распространенная точка зрения заключалась в том, что Ca^{2+} взаимодействует с карбоксилатными группами боковых цепей ЕЕЕЕ-локуса. Однако демонстрация того, что карбонильные группы скелета основной цепи формируют места с высокой аффинностью связывания для ионов K^+ в K^+-канале, стимулировала предположение, что Ca^{2+}-каналы подобно родственным им K^+-каналам могли бы также использовать атомы кислорода карбонильных групп скелета основной цепи, чтобы связывать ионы Ca^{2+}.

Блокирование протонами Ca^{2+}-каналов интенсивно изучалось еще до идентификации ЕЕЕЕ-локуса. Впоследствии было показано, что в основе протонного блока каналов, управляемых циклическими нуклеотидами, лежит протонирование карбоксильных групп глутаматов, находящихся внутри поры. Исходя из этого, можно было предположить, что и протонный блок Ca^{2+}-канала может быть также опосредован протонированием гомологов карбоксилатов ЕЕЕЕ-локуса. Исследование протонного блока при помощи метода точечных мутаций в области ЕЕЕЕ-локуса помогло выявить роль карбоксильных групп глутаматов ЕЕЕЕ-локуса. Когда сравнивали токи через одиночные каналы, имеющие мутации в определенных позициях ЕЕЕЕ-локуса, было обнаружено, что протоны могут по-разному изменять проводимость одиночного канала. Время жизни протонированного состояния также зависело от типа исследуемого мутанта. Результаты исследований раз-

личных мутантов варьировали в деталях, однако в целом протонный блок обеспечивается протонированием внутри EEEE-локуса. Более того, единичный протон может взаимодействовать одновременно с несколькими глутаматами EEEE-локуса. Тесное родство среди глутаматов EEEE-локуса, предположенное на основе последних данных, находится в соответствии с представлением, что все глутаматы формируют единственный локус высокоаффинного связывания Ca^{2+}.

9.6. Теории проницаемости Ca^{2+}-канала

9.6.1. Проницаемость каналов на основе теории скоростей реакции

Перед тем как переходить к рассмотрению теории проницаемости Ca^{2+}-канала, целесообразно еще раз сгруппировать все известные экспериментальные результаты и объяснить парадоксы, возникающие при обсуждении этих данных.

Экспериментальные наблюдения показали следующее:

1) Ca^{2+}-каналы выбирают ионы Ca^{2+} по сравнению с ионами Na^+ в соотношении 1 000 : 1, несмотря на то что ионы идентичны по размеру (2 Å в диаметре);

2) ток через одиночные Ca^{2+}-каналы лежит в пикоамперном диапазоне– это приблизительно миллион ионов в секунду, так что канал имеет только микросекунду, чтобы отличить Ca^{2+} от других ионов;

3) Ca^{2+}-канал может удерживать более чем один ион одновременно;

4) Ca^{2+}-каналы имеют два типа кажущегося сродства к ионам Ca^{2+}. Ca^{2+} блокирует одновалентный поток через канал при 10^{-6} M Ca^{2+}, тогда как Ca^{2+}-поток насыщается выше 10^{-2} M Ca^{2+};

5) EEEE-локус, образованный четырмя глутаматными остатками, так или иначе формирует высокоаффинный участок внутри Ca^{2+}-канала.

При обсуждении этих данных возникают два парадокса. Во-первых, как может канал так эффективно и быстро отличать два иона Ca^{2+} и Na^+, которые имеют идентичные размеры? Если высокоаффинные участки были свободны в растворе, то тогда максимальная off-rate от этого ($k_{off} = K_d k_{on}$) должна была бы быть приблизительно 1 000 в секунду – в 1 000 раз ниже, чем наблюдаемый Ca^{2+}-поток через пору. Во-вторых, как может пора пропукать потоки ионов намного бо́льшие, чем это представляется теоретически возможным?

Революционным достижением в истории изучения проницаемости каналов явилось открытие, что K^+-каналы содержат более

одного иона внутри поры. Первой моделью, при помощи которой пытались объяснить этот феномен, стала теория скоростей реакции (Rate Theory). Теория скоростей реакции в приложении к работе одиночного канала заключалась в создании двухмерной топографической карты поры с помощью предполагаемых «холмов» и «ям» химической потенциальной энергии, преодолеваемых ионом при прохождении через канал. «Ямы» — это места связывания; «холмы» — энергетические барьеры, которые препятствуют движению иона между связывающими местами или его выходу из поры. Поток, преодолевающий энергетический барьер, уменьшается по экспоненте с увеличением высоты барьера. Это основной принцип химической кинетики. Глубины «ям» определяются из констант связывания, определенных в экспериментах с конкурентными блокаторами.

На рис. 9.14 представлены модели, созданные на основе теории скоростей реакции для объяснения проницаемости Ca^{2+}-канала. Поскольку микромолярные концентрации ионов Ca^{2+} блокируют проникновение одновалентных ионов, каждая модель начинается с Ca^{2+}-связывающего места, имеющего константу диссоциации, величина которой измеряется микромолями. Это соответствует «потенциальной яме» с энергией приблизительно 14 kT ($\Delta G = kT\ln K_d$, где k — константа Больцмана; T — температура). Стрелка *1* обозначает энергетическую разницу, которая определяет высокую аффинность места связывания. Барьеры на внешней стороне поры должны быть достаточно высоки, так чтобы ионы не входили быстрее, чем реальная скорость диффузии. Это требует приблизительно 8 kT. Стрелка *2* показывает энергию, определяющую ограничивающую скорость (rate limiting step), т.е. наибольший энергетический барьер, который препятствует выходу иона из каждой модели поры.

Если был бы только один такой участок в поре (рис. 9.14, *а*), ион, проходящий эту пору, должен был преодолеть энергетический барьер 22 kT. Это соответствует скорости потока ионов через Ca^{2+}-каналы, меньшей чем 2 000 ионов в секунду, т.е. приблизительно в 1 000 раз меньше, чем величины пикоамперных токов. Этот подход математически строго показывает, что селективность не может быть получена просто — путем того, что пора становится «липкой» для специфического иона, потому что в этом случае ион перемещается через пору слишком медленно. Таким образом, модель, представленная на рис. 9.14, *а*, не может адекватно описать механизм проницаемости Ca^{2+}-каналов.

Теория скоростей реакции предлагает два независимых пути для обеспечения высокого потока ионов через «липкую» пору, но оба эти пути требуют, чтобы пора могла удерживать больше одного иона Ca^{2+} одновременно. В случае мультиионной поры наиболее вероятно, что пора имеет два измеримых сродства для Ca^{2+}. Блок

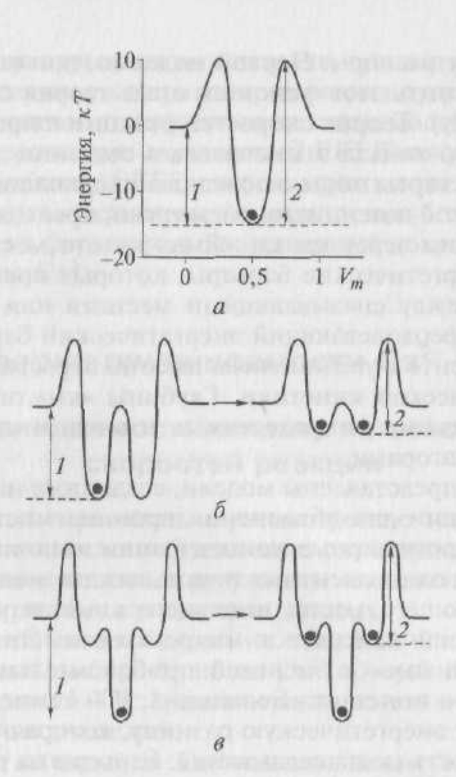


Рис. 9.14. Модели, созданные на основе теории скоростей реакции для объяснения проницаемости Ca^{2+}-канала:

а — пора с одним местом, связывающим ионы Ca^{2+}. По оси *x* показана фракция электрического поля через пору, по оси *y* — энергия химического потенциала для Ca^{2+}, когда он проходит через пору. Поток является очень низким в поре с одним участком, потому что имеется высокоэнергетический барьер (≈22 *kT*) для выхода; мультиионные поры представляют два различных механизма для уменьшения лимитирующего скорость потока энергетического барьера; *б* — взаимодействия иона с ионом (ion interaction); *в* — лестница шагов — «ступени» потенциальной энергии (stairsteps), вызванные низкоаффинными участками связывания; стрелка *1* соответствует микромолярному участку энергии, которая определяет Ca^{2+}-блок для ионов другого сорта; стрелка *2* указывает самый высокий прыжок в энергии в каждой модели, который ограничивает скорость выхода иона Ca^{2+} из поры

при микромолярной концентрации ионов Ca^{2+}, вероятно, отражает вход первого иона Ca^{2+} в пору. Насыщение тока Ca^{2+} между 10 и 100 ммоль/л, вероятно, происходит, когда все связывающие места в поре заняты.

На рис. 9.14, *б* показан механизм, используемый двумя идентичными участками высокоаффинного связывания. Один ион Ca^{2+} перебрасывается назад и вперед между ними с небольшим шансом для выхода. Поскольку в этих моделях ионы не могут ни «пе-

репрыгнуть» друг друга, ни войти в занятое место связывания, один ион Ca^{2+} преграждает вход ионам другого сорта. Но когда два иона Ca^{2+} находятся в поре, на основании представленной модели можно предположить, что они взаимодействуют, чтобы уменьшить аффинность мест связывания для Ca^{2+}. Эти более мелкие «колодцы» (стрелка *2*) допускают больший поток.

Природа взаимодействия между ионами неоднозначна, потому что такие модели имеют дело только с величиной энергии, но не с ее источником. Вероятными возможностями являются электрическое отталкивание между ионами Ca^{2+} и конкуренция за области связывания. Когда был обнаружен EEEE-локус, и было показано, что только он может быть высокоаффинным местом связывания Ca^{2+} в поре. Это опровергло понятие о двух идентичных связывающих местах, но взаимодействие между ионами остается вероятной силой для того, чтобы продвинуть поток. Таким образом, наличие EEEE-локуса опровергало детали модели, представленной на рис. 9.14, *б*, но не ее основной принцип. Независимо от факта обнаружения EEEE-локуса ряд исследователей возражали против того, что в поре есть только одно место высокоаффинного связывания, полагая, что имеются еще два боковых низкоаффинных места с каждой стороны. Это привело к созданию модели, представленной на рис. 9.14, *в*, на которой мелкие «колодцы» тесно примыкают с каждой стороны к одному глубокому.

В модели, представленной на рис. 9.14, *в*, у ионов нет возможности взаимодействовать, поэтому при мультиионной оккупации этой поры энергетические колодцы и барьеры не изменяются. Но простое присутствие низкоаффинных примыкающих мест означает, что ограничивающий скорость барьер для выхода (стрелка *2*) имеет примерно те же самые размеры, как в модели, где ионы имеют возможность взаимодействовать. По этой простой причине поток более или менее одинаков для двух моделей, и вычисления с использованием обеих моделей сходным образом воспроизводят экспериментальные данные.

Серия участков с уменьшающейся аффинностью ускоряет поток ионов через химические потенциальные энергетические барьеры аналогично тому, как лестница из ступеней ускоряет поток людей через гравитационный потенциальный барьер энергии. В начале этого подраздела был постулирован парадокс, что через Ca^{2+}-каналы проходит миллион ионов в секунду, несмотря на наличие участка связывания внутри поры, который может обеспечить ожидаемую скорость в виде тысячи ионов в секунду. Если авторы изложенной концепции правы в своем предположении, что низкоаффинные места примыкают к высокоаффинному селективному месту, то тогда нет никакого парадокса. Ионы Ca^{2+} могут просто «шагать» через пору к выходу.

9.6.2. Ограничения теории скоростей реакции

Вопрос о применимости теории скоростей реакции является предметом дискуссии. Исходя из стандартной химической кинетики, теория скоростей реакции, разумеется, верна, однако имеет определенные ограничения. Эта теория не затрагивает структуры канала и, следовательно, мало дает исследователям, заинтересованным в изучении структурных основ молекулярной функции. Теория скоростей реакции имеет дело с силами и энергиями, но делает это в определенной степени абстрактно, без учета физических расстояний, формы пор или местоположения атомов. Эта теория может сказать нам, какие силы нужно учитывать для понимания процессов проницаемости, но она не говорит нам, какие силы в действительности ответственны за проницаемость. Суммируя эти обсуждения, можно выделить модели, базируемые на структурных приближениях, и модели, основанные на предсказанных структурах. Обсудим их отдельно, отмечая, что нет принципиальных разногласий как между этими подходами, так и в пределах этих двух общих подходов.

Модели, использующие структурные приближения. В основе этих моделей лежит принцип трубы, форма которой имеет определенные детали, которые были предположены на основе экспериментов или по аналогии с другими ионными каналами. Исследуют поток через трубу, опираясь на соответствующие представления о диффузии. Есть два конкурирующих представления относительно диффузии через модель поры. Представители первого подхода начали с уравнений пассивной диффузии, используя математический аппарат, который описывает поток через кристаллы полупроводника. Это подход заключается в том, что рассматриваются ионы, двигающиеся путем скольжения через гомогенную среду. С допущением относительно константы диффузии Ca^{2+} в поре пассивная диффузия, примененная к широкой короткой поре (6 Å диаметр, 10 Å длина), успешно воспроизводит основные данные, касающиеся проницаемости Ca^{2+}-канала.

При втором подходе применяется броуновская динамика. Этот подход рассматривает индивидуальные ионы как сферы, двигающиеся в соответствии с броуновским движением, но в электрическом поле, так как они проходят через заряженную пору определенных размеров. Вода представлена как диэлектрическая среда.

На рис. 9.15 показана структура, используемая для анализа Ca^{2+}-канала с броуновской динамикой. Сама пора имеет форму песочных часов и похожа по форме на пору KcsA-канала, но с принципиальными различиями в селективном фильтре — наиболее узкой области. Диаметр этого фильтра равен 5,6 Å, т. е. почти в 3 раза шире, чем диаметр иона Ca^{2+}, поэтому селективность нельзя объяснить тесным совпадением диаметра иона и диаметра отвер-

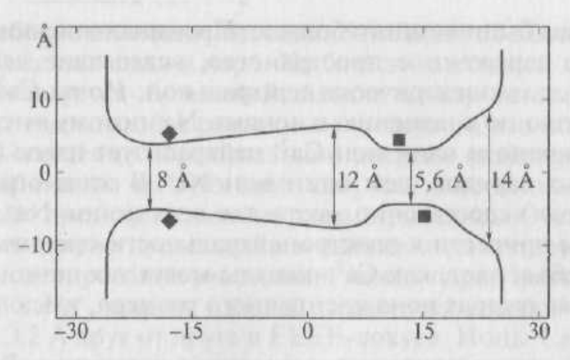


Рис. 9.15. Поперечный разрез жесткой поры, используемой для броуновской динамики. В общем форма поры похожа на KcsA-канал, особенно в том месте, где имеются узкий короткий селективный фильтр около внешней стороны и широкая область в центре мембраны. Однако селективный фильтр в этой модели Ca^{2+}-канала намного шире, и его длина намного короче, чем у K^{+}-канала

стия, что лежит в основе механизма селективности K^{+}-каналов. Важно, что заряды (квадратики) четырех глутаматов EEEE-локуса скорее находятся позади стенки селективного фильтра, чем внутри пространства поры. Эта простая структура воспроизводит необычную сигмоидальную форму вольт-амперных кривых Ca^{2+}-канала, чрезвычайную селективность для ионов Ca^{2+} по сравнению с ионами Na^{+}, насыщение тока в условиях увеличения концентрации Ca^{2+} и несколько других особенностей. Слабая сторона модели заключается в том, что приходится предположить наличие сильного электрического поля неизвестного происхождения, чтобы избежать нахождения одновременно нескольких ионов в широком месте поры. Возможно, что более узкая пора не создавала бы такую необходимость. Существенно, что жесткая пора без зарядов EEEE-локуса, направленных в просвет поры, может успешно воспроизвести характеристики Ca^{2+}-канала.

EEEE-локус должен так или иначе различать одинаковые по размерам ионы Ca^{2+} и Na^{+}. Но какой же физический механизм лежит в основе этого процесса? В двух работах, использующих независимые методы расчетов, был получен ответ на этот вопрос, причем выводы работ теперь кажутся просто очевидными. Обе модели предполагают, что восемь атомов кислорода четырех карбоксильных групп EEEE-локуса направлены в пору. При этом в модели каждый атом кислорода получал половину отрицательного заряда и возможность свободно диффундировать в пределах ограниченного пространства. В одной модели ограниченное пространство было равно 375 Å^3, причем каждая сторона была равна приблизительно 7 Å. В другой модели размеры этого ограниченного

пространства были немного больше. Проникающие ионы входят в это сильно заряженное пространство, вследствие чего система стремится стать электрически нейтральной. Ионы Ca^{2+} получают преимущество по сравнению с ионами Na^+ потому, что пространство ограничено и один ион Ca^{2+} нейтрализует вдвое больше отрицательных зарядов, чем один ион Na^+. В этом ограниченном пространстве недостаточно места для всех ионов Na^+, необходимых, чтобы привести к электронейтральности системы. Эта простая идея объясняет, как Ca^{2+}-каналы могут так четко дифференцировать два разных иона идентичного размера, имеющих разные заряды.

Модели, использующие предсказанные структуры. В последние годы было сделано несколько попыток предсказания структуры Ca^{2+}-канала, и все эти модели имеют общую черту, поскольку предполагают мобильные карбоксильные боковые цепи четырех главных глутаматов, колеблющихся в просвете поры, где они могут своими колебаниями способствовать прохождению ионов Ca^{2+}.

Следующий обсуждаемый вопрос связан с ЕЕЕЕ-локусом, который является главным для селективности Ca^{2+}, состоит из четырех глутаматов — по одному в каждой из четырех Р-петель. Однако имеющиеся модели не отвечают на три основных вопроса. Первый вопрос — имеет ли селективный фильтр жестко зафиксированный диаметр, образованный сторонами ЕЕЕЕ-локуса или селективный фильтр гибкий и его диаметр подстраивается под диаметр иона, который должен пройти? Второй вопрос связан с тем, действительно ли пора размещает несколько ионов одновременно? Третий вопрос — какая сила отсоединяет тесно связанный ион Ca^{2+}?

Существует несколько работ, авторы которых на основе анализа данных сходятся во мнении, что селективный фильтр гибок, однозначно отвечая тем самым на первый вопрос. В этих моделях рассматривается первая ситуация, когда нет иона, связанного внутри ЕЕЕЕ-локуса. В этом случае глутаматы отталкиваются друг от друга, создавая отверстие диаметром приблизительно 6 Å. Это совпадает с исследованиям, демонстрирующими, что ион тетраметиламмония несет ток в отсутствие ионов Ca^{2+}. Во второй ситуации, когда ион Ca^{2+} попадает в пору, это приводит к движению глутаматов внутрь (т.е. к их сближению), в результате чего диаметр отверстия уменьшается до 2 Å, чтобы точно соответствовать диаметру иона Ca^{2+}. Именно ион Ca^{2+} приводит к подобному движению глутаматов.

На второй вопрос авторы, создавшие упомянутые модели, отвечают положительно. Одна модель работает при размещении трех ионов Ca^{2+} в поре, другая модель рассматривает одновременное присутствие двух ионов Ca^{2+} в поре.

На третий вопрос ответ более сложен. На основе теории скоростей реакции были предложены модели, в которых рассматрива-

ются пути, обеспечивающие отсоединение иона от высокоаффинного участка связывания в поре. На базе этих моделей можно выяснить, используется ли взаимодействие между ионами или несколько мест связывания с различным сродством, что можно представить как «ступени» потенциальной энергии (stairsteps) или некоторая комбинация из этих двух сил, или еще какие-то другие силы, которые предварительно не рассматривались. Очевидно, что ответ на этот вопрос представлен в изложенном материале. Было проведено моделирование расстояния между парой ионов Ca^{2+} или ионами Ca^{2+} и Na^{+}, причем каждый первоначально помещался на расстоянии 3,2 Å друг от друга в EEEE-локусе. Ионы Ca^{2+} и Na^{+} не двигаются друг относительно друга, тогда как два иона Ca^{2+} внезапно отталкиваются примерно на 1 Å. Это указывает на то, что Na^{+} не может сместить ион Ca^{2+}, но другой ион Ca^{2+} может. Такая селективность может быть доказательством специфического взаимодействия между ионами.

При физиологической (миллимолярной) концентрации Ca^{2+} три иона Ca^{2+} выстраиваются в поре в стабильную линию, и средний ион связан внутри полости из четырех карбоксильных кислот. Внешние два связываются немедленно снаружи полости, и каждый ион взаимодействует с двумя кислотами, а не с четырьмя. Такая организация, в которой остатки кислорода групп карбоксила одновременно взаимодействуют со многими неорганическими ионами, широко представлена в структуре белка. Этот принцип дает поре центральный, сильный связывающий участок, граничащий с двумя низкоаффинными участками, совпадая с экспериментами и обеспечивая «ступени» потенциальной энергии для потока ионов.

Взаимодействие между ионами (отталкивание ионов) играет, по-видимому, незначительную роль в этой модели поры. Отталкивание обеспечивает движение между тремя связывающими участками, помогая таким образом заполнить пору ионами, но это не используется, чтобы обеспечить выход ионов из поры.

9.7. Активация и инактивация кальциевых каналов

9.7.1. Аналитическое описание

Активация Ca^{2+}-каналов, которая происходит только под влиянием изменения трансмембранного электрического потенциала, является их характерной чертой. Особенностью Ca^{2+}-токов является медленное нарастание (по сравнению с Na^{+}-токами) при смещении мембранного потенциала. Этот процесс описывают моно-

экспоненциальной функцией с постоянной времени активации (τ_a мс). Процесс постепенного ослабления ионного тока через Ca^{2+}-каналы при продолжающейся деполяризации представляет собой его инактивацию. Инактивация выглядит как уменьшение после достижения пикового значения Ca^{2+}-тока, вызванного деполяризующей ступенькой. Сложность кинетики этого процесса ставит экспериментатора перед проблемой описания его с использованием не одной, а двух экспонент. Для этого часто применяют выражение (7.3) (см. подразд. 7.4.3).

На рис. 9.16 на примере $I_{Ca\text{-}T}$-тока показаны принципы изучения активации и инактивации. Для изучения steady-state-активации в условиях фиксации потенциала авторы в течение 1 с использовали поддерживаемый потенциал, равный −100 мВ, а Ca^{2+}-токи выявляли при помощи деполяризующих мембрану ступенек электрических импульсов (рис. 9.16, *а*).

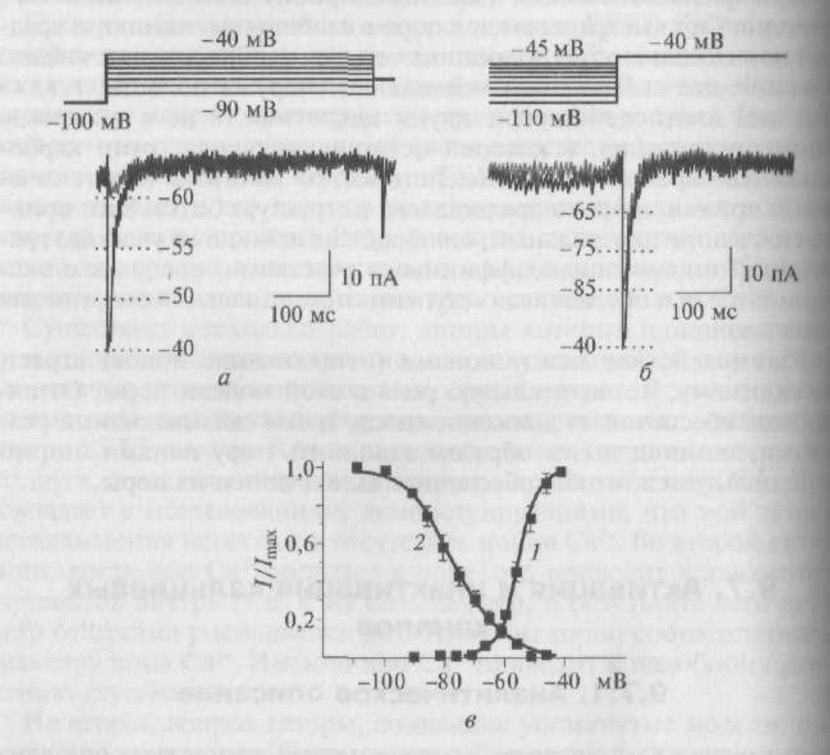


Рис. 9.16. Принципы регистрации и анализа активации и инактивации $I_{Ca\text{-}T}$-тока на примере Ca_V3-каналов:

а — тестовые сигналы и steady-state-активация $I_{Ca\text{-}T}$; *б* — тестовые сигналы и steady-state-инактивация $I_{Ca\text{-}T}$; *в* — наложение активационной (*1*) и инактивационной (*2*) кривых

Для изучения steady-state-инактивации в условиях фиксации потенциала авторы в течение 1 с использовали поддерживаемый потенциал в диапазоне от –110 до –45 мВ, а Ca^{2+}-токи выявлялись при помощи деполяризующих мембрану ступенек электрических импульсов до –40 мВ (рис. 9.16, *б*).

Анализ активации и инактивации Ca^{2+}-тока выполняется на основе уравнений Больцмана, причем активационная кривая строится на основе формы уравнения (7.4), а инактивационная кривая — на форме уравнения (7.5) (см. подразд. 7.4.3).

Кривые активации и инактивации обычно накладывают друг на друга, а по оси абсцисс откладывают и значения потенциалов ступенек для активационной кривой и значения предимпульсных потенциалов для инактивационной кривой, как это показано на рис. 9.16, *в*.

9.7.2. Молекулярные механизмы

Молекулярные механизмы активации и инактивации потенциалуправляемых Ca^{2+}-каналов наименее изучены. Напомним, что порообразующая субъединица Ca^{2+}-канала (α_1) имеет структуру, включающую четыре гомологичных домена (I—IV), каждый из которых содержит шесть трансмембранных сегментов (S1—S6). Ca^{2+}-каналы классифицировали в соответствии с их структурой, электрофизиологическими характеристиками, чувствительностью к фармакологическим агентам. Наличие нескольких классификаций, о которых речь пойдет ниже, хотя и создает определенные сложности при прочтении научных работ, но является скорее преходящей проблемой. Однако ряд вопросов, к которым относятся процессы активации и инактивации Ca^{2+}-каналов, даже в настоящее время являются предметом интенсивных исследований.

Основные результаты, касающиеся воротных механизмов потенциалуправляемых каналов, были получены в работах на K^+- и Na^+-каналах. Для них было установлено, что при изменении мембранного потенциала сегмент S4 перемещается. При деполяризации этот сегмент перемещается внутри мембраны в сторону внеклеточной среды. Дополнительно было показано также вращательное движение сегмента S4. Это привело к созданию альтернативной модели, описывающей траекторию перемещения сегмента S4 движением, сходным с движением весла. Это так называемая модель «весла». За последующие два года эта модель широко распространилась в литературе, однако ранее мы обсудили ее недостатки.

В противоположность этим исследованиям, выполненным на K^+- и Na^+-каналах, очень немногие работы были посвящены роли

сегмента S4 у Ca^{2+}-каналов. На молекулярном уровне совершенно не понятно, почему Ca_V3-каналы представляют собой каналы с низким порогом активации, тогда как Ca_V1- и Ca_V2-каналы являются каналами с высоким порогом активации. Дж.Ли и соавторы (J.Li et al.) попытались разрешить эту проблему путем создания ряда химер между каналом с низким порогом активации $Ca_V3.1$ (α_{1G}) и каналом с высоким порогом активации $Ca_V1.2$ (α_{1C}). Результаты показали, что замена отдельных доменов I, III или IV у $Ca_V3.1$-канала на соответствующие домены от $Ca_V1.2$ вела к образованию канала с высоким порогом активации подобно $Ca_V1.2$-каналу. Однако замена домена II у $Ca_V3.1$ на соответствующий домен от $Ca_V1.2$ лишь слегка сместила вольт-амперную кривую в сторону более высокого порога активации, но не привела к образованию канала с высоким порогом активации.

Таким образом, домены в Ca^{2+}-канале играют различную роль в процессе активации канала. Так, сравнивая $Ca_V3.1$- и $Ca_V1.2$-каналы, можно заключить, что домены I, III и IV вносят принципиальный вклад в зависимость активации от потенциала. Напротив, домен II, оказывающий менее заметный вклад в зависимость активации от потенциала, играет в большей степени модуляторную роль. В другой серии экспериментов целые сегменты S4 в $Ca_V3.1$-канале были заменены их копиями от $Ca_V1.2$-канала. Удивительно, но такая принципиальная замена не объяснила разной зависимости от потенциала у $Ca_V3.1$- и $Ca_V1.2$-каналов. Возможная интерпретация этих данных заключаются в том, что сенсором напряжения являются не сами сегменты S4, а комплекс сегментов S1—S4, которые вместе определяют чувствительность к потенциалу, или, что нельзя также исключить, некоторая другая область канала, например такая, как пора, тоже может влиять на чувствительность канала к потенциалу. Таким образом, результаты экспериментов позволяют предположить, что потенциалчувствительность каналов определяется, скорее всего, не каким-то одним локальным участком канального белка, а скорее комплексом сегментов и/или структур. Опираясь на это предположение, были исследованы два аспекта активации Ca^{2+}-канала.

1. Путем создания химер попытались найти молекулярные регионы, которые являются решающими в определении различий между каналами, активирующимися при низких (каналы с низким порогом активации) и высоких потенциалах (каналы с высоким порогом активации). Для этого были сделаны химеры, представляющие собой смесь канала с низким порогом активации $Ca_V3.1$ и канала с высоким порогом активации $Ca_V1.2$. Поскольку домены I и II играют разную роль в открытии канала, сравнили молекулярные регионы, которые определяют зависимость активации от потенциала для этих двух доменов. Для домена I было обнаружено, что молекулярный регион, который

является важным в определении потенциалуправляемой активации канала, включает регионы поры S5-P, так же как и P-S6, но удивительно, что не регион сенсора напряжения S1—S4, который, как можно было бы ожидать, должен был играть главную роль. Домен II по сравнению с доменом I играет существенно меньшую роль в определении потенциалуправляемой активации канала. Его роль, заключающаяся скорее в модулировании потенциалуправляемой активации, определялась вовлечением обоих регионов S1—S4 и S5—S6. Однако линкер I—II в процесс не вовлекался.

2. Было исследовано движение сегмента S4 в домене I при активации канала. Для этого использовали метод поиска и замены остатков цистеина (cysteine-scanning mutagenesis) сегмента S4 домена I. Идея метода состоит в приложении цистеинсвязывающего соединения (в данном случае парахлормеркурибензенсульфонат — PCMBS), которое является:

1) водорастворимым веществом и не проникает в клеточную мембрану;

2) необратимо связывает (иммобилизирует) цистеин.

Таким образом, если при деполяризации какая-либо часть белка, содержащая остаток цистеина, выйдет из билипидного слоя во внеклеточную среду, PCMBS, связавшись с цистеином, предотвратит обратное движение и предположительно изменит потенциалчувствительность канала. Последующий анализ точечных замен остатков цистеина показывает, какой именно остаток и/или часть молекулы важны для выполнения функции. Результаты показали, что PCMBS ингибировал токи у мутантов V263, A265, L266 и A268, но не у мутантов F269 и V271. Ингибирование зависимости активации канала от потенциала при замене остатка V263 показало, что сегмент S4 перемещается перед открытием канала. Полученные результаты подтверждают движение сегмента S4 в направлении внеклеточной среды. Более того, данные показывают, что вследствие этого движения аминокислотные остатки сегмента S4 вплоть до остатка 268 выходят за пределы липидного слоя.

Эти результаты требуют более детального обсуждения. Вначале попробуем систематизировать данные, касающиеся активационных ворот. Для домена I, который в значительной степени определяет активационные свойства, показано, что регион сенсора напряжения S1—S4 не определяет порог активации кальциевого канала. Более вероятным является участие региона поры S5—S6, а также остатков региона поры домена I (т.е. регион S5 плюс его линкер в начале P-спирали и регион P-спирали — селективный фильтр — S6). Внутриклеточный линкер I—II также не определяет, является ли порог активации канала высоким или низким. Домен II, хотя и оказывает меньшее влияние на потенциалзави-

симость процесса активации канала, но оба его региона (S1—S4 и S5—S6) влияют на порог активации.

Неожиданным является также открытие, что сенсор напряжения региона S1—S4 домена I не определяет процесс активации. Эти данные согласуются с работами, в которых показано, что сегмент S4 домена I непосредственно не определяет и порог активации. Более того, этот вывод согласуется с данными, полученными путем измерения воротных токов различных потенциалчувствительных кальциевых каналов.

В этих исследованиях было показано, что воротные токи предшествуют на 30—40 мВ открытию каналов с высоким порогом активации и только на 10 мВ — для каналов с низким порогом активации*, т.е. независимо от того, обладает ли канал низким или высоким порогом активации, сенсор напряжения перемещается при достаточно сходных потенциалах. Таким образом, можно сделать вывод, что активационные ворота сходны у различных типов кальциевых каналов.

Тот факт, что область поры домена I также влияет на зависимость активации от напряжения, позволяет предположить, что ключевой момент, определяющий зависимость активации Ca^{2+}-каналов от напряжения, определяется, во-первых, потенциалзависимостью самой связи между сенсором напряжения и воротами или, во-вторых, самим движением области поры. Действительно, К.Талавера и соавторы (K.Talavera et al.), используя метод точечных мутаций в селективном фильтре для $Ca_V3.1$-канала, показали существенное изменение потенциалзависимости процесса активации этих каналов. Интересно также наблюдение, что изменение, например, области S5-P не только влияет на $V_{0,5}$, но изменяет константу k, т.е. наклон кривой**. Кроме того, активационные ворота Ca^{2+}-каналов могут непосредственно влиять на потенциалзависимость канала. Таким образом, можно сделать вывод, что порог активации потенциалзависимого кальциевого канала, по-видимому, определяется не только свойствами активационных ворот, но и в значительной степени взаимодействием различных сегментов каналообразующих белков.

---

* Основной вопрос заключается в следующем: когда движутся ворота (в милливольтах), а когда (также в милливольтах) открывается канал? Если предположить очень медленное нарастание потенциала, то открытие ворот (воротный ток) происходит на 30 мВ раньше, чем открытие высокопорогового канала (т.е. появление кальциевого тока), и только на 10 мВ — у низкопорогового, т.е. примерно при том же потенциале.

** В данном случае имеется в виду уравнение Больтцмана:

$$I = (V - V_{rev})G_{max}/[1 + \exp(V_{0,5} - V)/k],$$

где I — пиковый ток; V — тестовый потенциал; V_{rev} — потенциал реверсии; G_{max} — максимальная проводимость; $V_{0,5}$ — потенциал полуактивации; k — константа, представляющая собой наклон кривой (фактор крутизны).

Рассмотрим также вопрос — применима ли модель «весла» для описания работы Ca^{2+}-каналов? Исследования движения (перемещения) сегмента S4 домена I показали, что при деполяризации часть этого сегмента (до аминокислотного остатка 268) обращена во внеклеточную среду (находится вне клеточной мембраны), а аминокислотные остатки A268, 269 и 271 остаются в пределах мембраны. Детальное изучение потенциалзависимости перемещений остатка 263 показало, что движение сегмента S4 обнаруживается даже при гиперполяризации (–110 мВ). Интерпретация этих данных предполагает, что по крайней мере один сегмент S4 у канала должен перемещаться за пределы клеточной мембраны под действием этого гиперполяризующего стимула.

Результаты этих экспериментов демонстрируют, что движение сегмента S4 в Ca^{2+}-канале происходит при потенциалах, более отрицательных, чем потенциалы, необходимые для открытия канала. Это коррелирует с вышеприведенными данными о том, что воротные токи предшествуют активации $Ca_V1.2$- и $Ca_V3.1$-каналов. Также эти эксперименты ставят под сомнение применимость модели «весла», которая предполагает, что заряды движутся внутри клеточной мембраны.

Отдельно рассмотрим роль домена II. При менее заметном вкладе в зависимость активации от потенциала обе области домена II — и сенсор напряжения S1—S4, и регион поры S5—S6 — влияют на потенциалзависимость процесса активации. Модулирующая функция домена II может быть объяснена следующим образом. Хотя домен II принципиально не управляет открытием Ca^{2+}-канала, он может модулировать связь между доменами I, III и IV как через регион S1—S4, так и через регион поры S5—S6 в домене II. Для Na^{+}-каналов было показано, что домены I, II и III являются ключевыми областями для активации канала, в то время как движение домена IV в течение активации запускается тремя другими доменами. Возможно, что подобная ситуация справедлива и для Ca^{2+}-канала, когда движение домена II запускается движением трех других доменов.

В заключение рассмотрим процесс инактивации потенциалзависимых кальциевых каналов. К сожалению, инактивационные ворота в Ca^{2+}-каналах еще не локализованы. Было показано, что регион поры (S5-P и P-S6), а не регион S1—S4 домена I существенно влияет на инактивационные свойства. Это находится в согласии с результатами по обмену домена I или IS4, а также с работами, показывающими, что сегмент S6 в домене I важен в определении инактивации Ca^{2+}-каналов.

Для домена II химер, в котором у $Ca_V3.1$-канала области S1—S4 и S5—S6 заменены соответствующими областями от $Ca_V1.2$-канала, так же как для линкера I—II химеры, инактивация оставалась временной, скоротечной (transient), что, вероятно, означает менее

важную роль в процессе инактивации домена II. Вместе с тем инактивация у этих трех химер была приблизительно в 2 раза медленнее, чем у контрольного $Ca_V3.1$-канала, что позволяет допустить модуляторную роль домена II. Кроме того, $Ca_V3.1$-каналы, в которых весь домен II и линкер I—II были заменены аналогичными областями от $Ca_V1.2$-канала, обладали более медленной инактивацией, чем химеры по домену II (обмен S1—S4 или S5—S6) или для линкера I—II химеры. Эти данные позволяют предположить, что процесс инактивации, как и в случае с активацией кальциевых каналов, определяется взаимодействием этих трех регионов (т.е. S1—S4, S5—S6 и линкера I—II).

Резюмируя изложенное, можно отметить, что домен I Ca^{2+}-каналов имеет ключевое значение, практически определяя, обладает ли канал низким или высоким порогом активации, и влияет также на процесс инактивации канала. Молекулярный регион, который является ключевым в определении этих свойств, включает оба поровых региона S5-P и P-S6, но не регион сенсора напряжения S1—S4. Домен II имеет менее важное значение в определении зависимости активации и инактивации от потенциала, чем домен I, но регионы S1—S4 и S5—S6 играют принципиальную роль. При деполяризации сегмент S4 домена I $Ca_V1.2$-канала перемещается так, что аминокислоты до остатка 268 сегмента S4 становятся выставленными во внеклеточную среду. Это направленное наружу движение происходит при более отрицательных потенциалах, чем потенциалы открытия каналов, т.е. предшествуют открытию каналов.

9.8. Кальциевые каналы Ca_V1

Наиболее изучены Ca_V1-каналы, опосредующие L-тип кальциевых токов скелетных мышц, которые являются одновременно и Ca^{2+}-каналами и сенсором напряжения для электромеханического сопряжения. Эти каналы являются связующим звеном между деполяризацией клеточной мембраны, а также внутриклеточного высвобождения Ca^{2+} через рианодиновый рецептор. Участки, определяющие электромеханическое сопряжение в скелетной мышце, являются триадами, которые представляют собой высокоорганизованные соединения, включающие t-трубочки и основной саркоплазматический ретикулум. Локализация Ca_V1-каналов преобладает в t-трубочках в тесном взаимодействии с рианодиновым рецептором в саркоплазматическом ретикулуме.

Как отмечалось, подсемейство Ca_V1 включает каналы, содержащие α_{1S}-, α_{1C}-, α_{1D}- и α_{1F}-субъединицы, которые опосредуют L-тип (высокопороговый, медленно инактивирующийся тип) кальциевых токов. На рис. 9.17 показан пример основных характе-

ристик, определяемых при регистрации тока от одиночного канала подсемейства Ca_V1 (тока L-типа).

На рис. 9.17, *а* показана оригинальная регистрация тока, текущего через одиночный канал на фоне ступени деполяризации, равной +10 мВ, от поддерживаемого потенциала, равного −40 мВ. На рис. 9.17, *б* показано распределение амплитуд тока при +10 мВ. Обычно предполагается, что амплитудная гистограмма хорошо описывается кривой Гаусса, если под пипеткой находится один канал и у него есть только одно открытое состояние, как это продемонстрировано на рис. 9.17, *а*. На рис. 9.17, *б* показана гауссовская кривая, которая позволяет оценить среднюю амплитуду тока (событий) и погрешность аппроксимации (стандартное отклонение), т. е. для данного случая это (1,21 ± 0,02) пА при +20 мВ. По зависимости величин зарегистрированного тока от амплитуд сту-

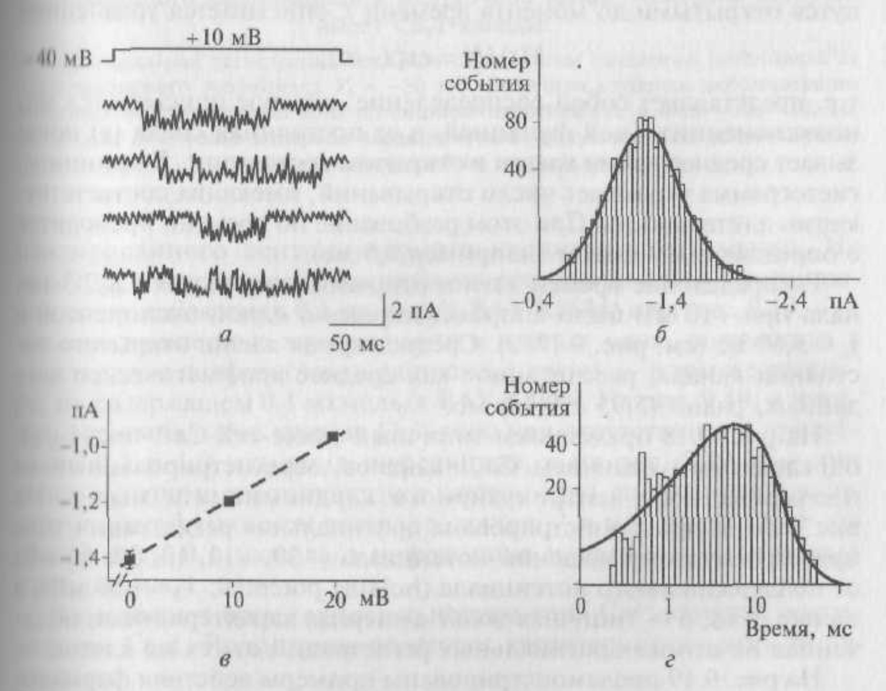


Рис. 9.17. Биофизические свойства Ca_V1-канала с L-типом Ca^{2+}-тока, зарегистрированного в cell-attached patch у кортикальных астроцитов:

а — регистрация тока одиночного канала подсемейства Ca_V1 (тока L-типа) на фоне ступени деполяризации, равной +10 мВ от поддерживаемого потенциала V_h = −40 мВ. Раствор в patch-пипетке содержал 10 мкмоль/л CTx-MVIIC и 5 мкмоль/л Bay K 8644; *б* — распределение амплитуд тока L-типа при +10 мВ; *в* — наклон кривой — проводимость одиночного канала, рассчитанная по величине зарегистрированного тока L-типа; *г* — гистограмма распределения времени жизни открытого состояния канала подсемейства Ca_V1 при +10 мВ

пенек деполяризации (рис. 9.17, *в*) можно определить проводимость одиночного канала, т.е. наклон кривой (или, иначе, фактор крутизны). Амплитуда тока была (–1,41 ± 0,03) и (–0,97 ± 0,02) пА при 0 и + 20 мВ соответственно, а проводимость одиночного канала в приведенном случае равна (22,0 ± 1,1) пСм.

Наконец, дополнительную информацию о механизмах функционирования каналов можно получить из анализа гистограмм распределения времен жизни открытого/закрытого состояния канала (рис. 9.17, *г*). Интерпретация последних обычно довольно сложная. Упрощенный подход, который справедлив для всех типов каналов, можно представить себе следующим образом. Рассмотрим время нахождения канала в открытом состоянии. Предположим, что открытие канала определяется одновременным открытием N ворот. Все ворота при этом открываются случайным образом со средней скоростью α. Тогда вероятность того, что все ворота останутся открытыми до момента времени t, описывается уравнением

$$N(t)/N = \exp(-\alpha t),$$

т.е. представляет собой распределение, которое описывается моноэкспоненциальной функцией, а ее постоянная спада (τ) показывает среднее время жизни в открытом состоянии*. В принципе, гистограмма указывает число открываний, имеющих соответствующую длительность. При этом разбивание по времени проводится с определенным шагом (например 0,5 мс).

Распределение времен жизни открытого состояния $Ca_V2.3$-канала при +10 мВ было аппроксимировано одной экспонентой с τ_o = 5,60 мс (см. рис. 9.17, *г*). Среднее время жизни открытого состояния канала, рассчитанное как среднее арифметическое всех данных, равно (5,95 ± 0,24) мс.

На рис. 9.18 представлен типичный whole-cell Ca^{2+}-ток ($I_{Ca\text{-}L}$), определяемый наличием Ca_V1-каналов, зарегистрированный от изолированного вентрикулярного кардиомиоцита мыши. На рис. 9.18, *а* продемонстрирована оригинальная регистрация тока при ступенчатом смещении потенциала (–30, –10, 10, 30, 50 мВ) от поддерживаемого потенциала (holding potential: V_h = –50 мВ), а на рис. 9.18, *б* — типичная вольт-амперная характеристика, полученная на основе оригинальных регистраций от тех же клеток.

На рис. 9.19 продемонстрированы примеры действия фармакологических препаратов на типичный whole-cell Ca^{2+}-ток ($I_{Ca\text{-}L}$), определяемый наличием Ca_V1-каналов, зарегистрированный от

---

* *Типичной ошибкой при построении и интерпретации гистограммы распределения времен жизни канала в открытом состоянии является, например,* построение гистограммы на основе регистрации пачечного открывания. В этом случае мы наблюдаем длинное событие только потому, что имеющаяся аппаратура не может зарегистрировать очень короткие переходы в закрытое состояние

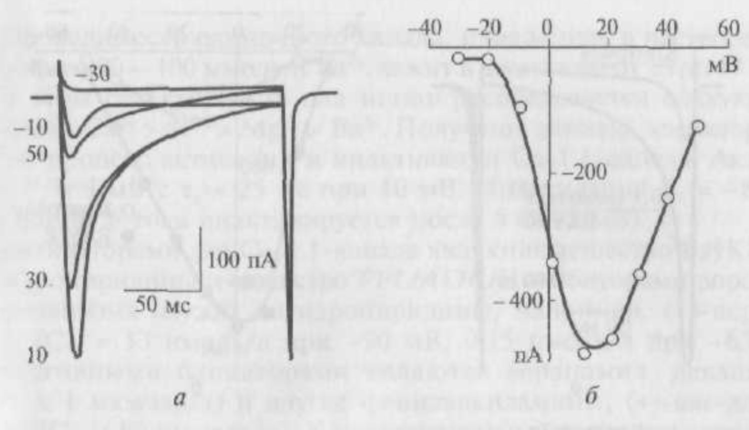


Рис. 9.18. Типичный whole-cell Ca^{2+}-ток ($I_{Ca\text{-}L}$), зарегистрированный от изолированного кардиомиоцита желудочков мыши, мембрана которого имеет Ca_V1-каналы:

а — оригинальная регистрация тока при ступенчатом смещении потенциала от поддерживаемого потенциала V_h = –50 мВ. Величина ступенек деполяризации относительно поддерживаемого потенциала представлена в виде –30, –10, 10, 30, 50 мВ; *б* — вольт-амперная характеристика, полученная на основе оригинальных регистраций от тех же клеток

изолированного вентрикулярного кардиомиоцита мыши. На рис. 9.19, *а* представлена контрольная регистрация тока и регистрация после добавления 0,1 мкмоль/л BAY K8644, а на рис. 9.19, *б* — две вольт-амперные характеристики клетки: одна, полученная в стандартном перфузионном растворе, а другая — в том же растворе, но содержащем 0,1 мкмоль/л BAY K8644. На рис. 9.19, *в* показаны оригинальные кривые Ca^{2+}-тока при отсутствии и в присутствии 0,1 и 1,0 мкмоль/л нифедипина, а на рис. 9.19, *г* — три вольт-амперные характеристики клетки: одна, полученная в стандартном перфузионном растворе, другая — в том же растворе, но содержащем 0,1 мкмоль/л нифедипина и третья — 1 мкмоль/л нифедипина.

В настоящее время известно четыре типа Ca^{2+}-каналов подсемейства Ca_V1. Рассмотрим основные характеристики этих типов каналов.

Кальциевый канал $Ca_V1.1$. *Раньше $Ca_V1.1$-канал раньше имел* несколько разных названий, которые можно встретить в литературе: α_{1S}-кальциевый канал, Ca^{2+}-канал L-типа скелетной мышцы, дигидропиридиновый рецептор скелетной мышцы. Гены для $Ca_V1.1$-канала были впервые изолированы и охарактеризованы у кролика (1873аа, PO7293, XO5921). В настоящее время аналогичная информация известна для человека (1873аа, L06234, chr. 1q32, CACNA1S), крысы (1146аа — частичная последовательность,

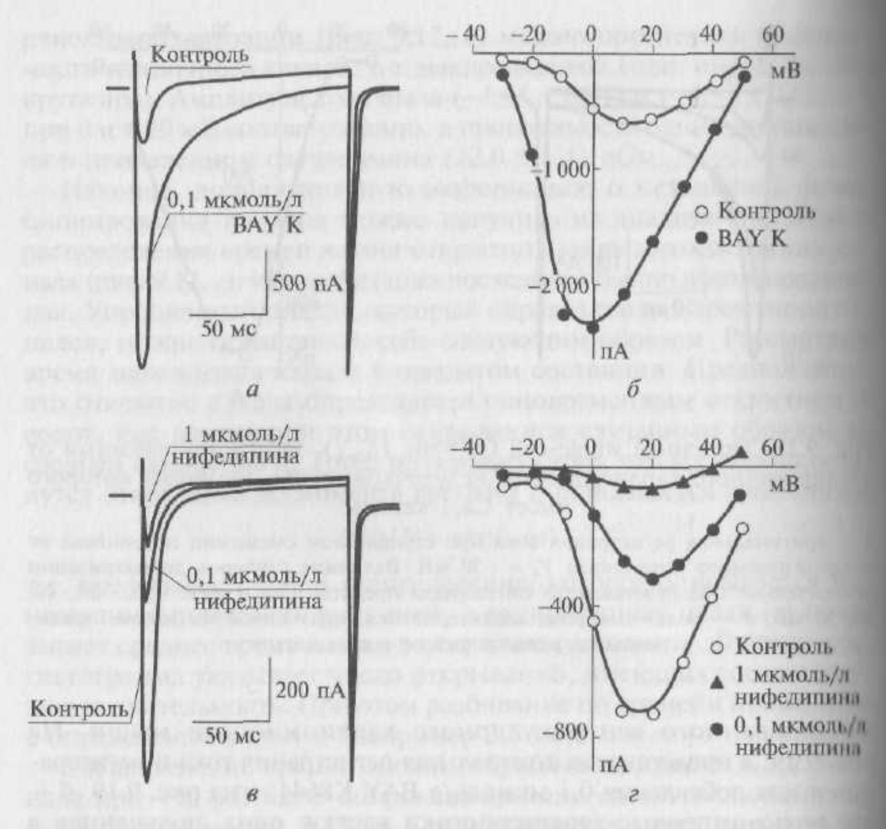


Рис. 9.19. Примеры действия фармакологических препаратов на типичный whole-cell Ca^{2+}-ток ($I_{Ca\text{-}L}$), зарегистрированный от изолированного кардиомиоцита желудочков мыши, мембрана которого имеет Ca_V1-каналы:

а, в — оригинальные кривые Ca^{2+}-тока в отсутствие и в присутствии соединений. Показано изменение Ca^{2+}-тока после добавления 0,1 мкмоль/л BAY K8644 или 0,1 и 1 мкмоль/л нифедипина. Деполяризуюшие импульсы до 0 или +20 мВ соответственно были поданы от поддерживаемого потенциала V_h = −50 мВ; *б, г* — соответствующие вольт-амперные характеристики вентрикулярных миоцитов мыши в отсутствие и в присутствии тестируемых соединений

Q02485, L04684) мыши (1351аа — частичная последовательность, L06234).

Было показано, что у $Ca_V1.1$-канала с α_1-субъединицей связаны также $\alpha_2\delta$-, β- и γ-субъединицы. Функциональный анализ этого канала был проведен методами patch-clamp (в конфигурациях whole-cell, single channel), визуализацией Ca^{2+} с помощью флюоресцентных меток (calcium imaging), движения заряда при открытии/закрытии канала (gating charge movement) и измерениями механической активности скелетной мышцы.

Проводимость одиночного канала, измеренная в растворе, содержащем 90—100 ммоль/л Ba^{2+}, лежит в диапазоне от 13 до 17 пСм. При этом селективность для ионов распределяется следующим образом: $Ca^{2+} > Sr^{2+} > Mg^{2+} > Ba^{2+}$. Получены данные, характеризующие процесс активации и инактивации $Ca_V1.1$-канала. Активация $V_a = 8$ мВ с $\tau_a = 25$ мс при 10 мВ. Инактивация $V_h = -8$ мВ, причем 40 % тока инактивируется после 5 с (–5 мВ).

Активаторами для $Ca_V1.1$-канала являются вещество BayK8644, дигидропиридины и вещество FPL64176. Ингибиторами воротного механизма служат дигидропиридины, например, (+)-исрадипин; $IC_{50} = 13$ нмоль/л при –90 мВ, 0,15 нмоль/л при –65 мВ. Селективными блокаторами являются верапамил, девапамил ($IC_{50} < 1$ мкмоль/л) и другие фенилалкиламины, (+)-*цис*-дилтиазем ($IC_{50} < 80$ мкмоль/л). К неселективным блокаторам относится кадмий ($IC_{50} < 0,5$ ммоль/л). Известны радиоактивные лиганды (+)-[^{3}H]-исрадипин ($K_d = 0,2—0,7$ нмоль/л) и другие дигидропиридины; (–)-[^{3}H]-девапамил ($K_d = 2,5$ нмоль/л), (+)-*цис*-[^{3}H]-дилтиазем ($K_d = 50$ нмоль/л).

Эти каналы распространены в поперечных тубулах скелетной мышцы (тетрамеры). Показано, что их физиологическими функциями являются электромеханическое сопряжение и гомеостаз Ca^{2+} в скелетной мышце.

Фармакологическое значение $Ca_V1.1$-каналов до настоящего времени не установлено.

Мутации приводят к выраженной патологии. Точечные мутации вызывают гипокалиемический периодический паралич и злокачественную гипертермию, к которой восприимчивы люди, и мышечную дисгенезию у мышей (*mdg/mdg*).

Кальциевый канал Ca_V1.2. Раньше $Ca_V1.2$-канал имел несколько разных названий, которые можно встретить в литературе: α_{1C}-кальциевый канал, Ca^{2+}-канал L-типа сердечной или гладкой мышцы, дигидропиридиновый рецептор сердечной или гладкой мышцы. Гены для $Ca_V1.2$-канала были впервые изолированы и охарактеризованы у кролика (2171аа, P15381, X15539). Аналогичная информация получена для человека — 2221аа, Q13936 (гены канала, расположенного в мембране клеток сердца), L04569 (гены канала, также расположенного в мембране клеток сердца), chr. 12p13.3, CACNA1C; крысы — 2169аа, P22002 (сердце), M59786 и мыши — 2139аа, Q01815 (сердце), L01776 (сердце). Существуют тканеспецифичные варианты сплайсинга. Помимо клонов каналов клеток сердца были клонированы каналы клеток гладких мышц (2169аа) и каналы клеток мозга (2140—2144аа).

Было показано, что у $Ca_V1.2$-канала с α_1-субъединицей связаны также $\alpha_2\delta$-, β- и γ-субъединицы. Функциональный анализ этого канала был проведен методами patch-clamp (конфигурации whole-cell, single channel), визуализацией Ca^{2+} с помощью флюо-

ресцентных меток (calcium imaging) и измерениями механической активности скелетной и гладкой мышцы.

Проводимость одиночного канала, измеренная в растворе Ba^{2+} (25 пСм) > Sr^{2+}, равна Ca^{2+} (9 пСм). При этом селективность для ионов распределяется следующим образом: $Ca^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+} \gg Mg^{2+}$. Получены данные, характеризующие процесс активации и инактивации канала. Активация V_a составляет от –4 мВ (в 15 ммоль/л Ba^{2+}) до –17 мВ (в 2 ммоль/л Ca^{2+}) с τ_a = 1 мс при +10 мВ. Инактивация V_h составляет от –50 до –60 мВ (в 2 ммоль/л Ca^{2+}), от –18 до –28 мВ (в 10—15 ммоль/л Ba^{2+}); τ_f = 150 мс, τ_s = 1 100 мс (при V_{max} в 15 ммоль/л Ba^{2+}).

Активаторами для $Ca_V1.2$-канала являются соединения Bay K 8644, дигидропиридины и вещество FPL64176. Ингибиторами воротного механизма служат дигидропиридины, например исрадипин (IC_{50} = 7 нмоль/л при –60 мВ), нимодипин (IC_{50} = = 139 нмоль/л при –80 мВ). Селективными блокаторами являются девапамил (IC_{50} = 50 нмоль/л в 10 ммоль/л Ba^{2+} при –60 мВ) и другие фенилалкиламины, дилтиазем (IC_{50} = 33 мкмоль/л в 10 ммоль/л Ba^{2+} при –60 мВ и 0,05 Гц). К неселективным блокаторам относится кадмий. Известны радиоактивные лиганды (+)-[^{3}H]-исрадипин (K_d < 0,1 нмоль/л) и другие дигидропиридины; (–)-[^{3}H]-девапамил (K_d = 2,5 нмоль/л), (+)-*цис*-[^{3}H]-дилтиазем (K_d = 50 нмоль/л).

Эти каналы распространены в сердечной мышце, гладкой мышце (включая кровеносные сосуды, кишечник, легкие и выделительную систему), клетках эндокринной системы (включая панкреатические β-клетки, гипофиз), нейронах. Изучение локализации этого типа каналов на клеточном уровне показало, что они сконцентрированы в гранулосодержащих зонах панкреатических β-клеток, а у нейронов локализованы преимущественно в мембране проксимальных дендритов и телах клеток.

Показано, что их физиологической функцией является электромеханическое сопряжение в сердечной или гладкой мышце. Кроме того, они обеспечивают пролонгирование потенциала действия клеток синоатриального и атриовентрикулярного узлов. С этими каналами связана и пластичность синапсов, и секреция гормонов.

Фармакологическое значение $Ca_V1.2$-каналов заключается в том, что через них опосредуется действие на сердечно-сосудистую систему Ca^{2+}-антагонистов, используемых в клинической практике.

Мутации приводят к выраженной патологии, поскольку эти каналы, как показано в экспериментах на мышах и рыбах, необходимы для процессов нормального эмбриогенеза.

Кальциевый канал $Ca_V1.3$. Раньше $Ca_V1.3$-канал имел несколько разных названий, которые можно встретить в литературе: α_{1D}-кальциевый канал, нейроэндокринный Ca^{2+}-канал L-типа. Гены

для $Ca_V1.3$ известны у человека — 2161аа (мозг), Q01668, M76558, chr. 3p14.3, CACNA1D и крысы — 1646аа (мозг), M57682. Существуют тканеспецифичные варианты сплайсинга. Помимо каналов клеток мозга и панкреатических β-клеток (2181аа у человека, 2203аа у крысы) были также клонированы каналы волосковых клеток улитки.

Было показано, что у $Ca_V1.3$-канала с α_1-субъединицей с большой степенью вероятности связаны по крайней мере α_2-, β- и δ-субъединицы. Функциональный анализ этого канала был проведен методами patch-clamp в конфигурациях whole-cell и single channel, а также визуализацией Ca^{2+} с помощью флюоресцентных меток (calcium imaging). Однако проводимость одиночного канала пока не определена. Не установлена и ионная селективность $Ca_V1.3$-канала. Получены данные, характеризующие процесс активации и инактивации канала. Активация V_a составляет от −18 (в 15 ммоль/л Ba^{2+}) до −20 мВ (в 2 ммоль/л Ca^{2+}); $\tau_a < 1$ мс при +10 мВ. Инактивация V_h составляет от −27 до −57 мВ, $\tau_f = 190$ мс, $\tau_s = 1\,700$ мс (при V_{max}).

Активаторами для $Ca_V1.3$-канала является соединение Bay K 8644. Ингибиторами воротного механизма служат дигидропиридины, например исрадипин (IC_{50} = 30 нмоль/л при −50 мВ, 300 нмоль/л при −90 мВ), нимодипин (IC_{50} = 3 мкмоль/л при −80 мВ). К неселективным блокаторам относится кадмий. Известны радиоактивные лиганды (+)-[^{3}H]-исрадипин ($K_d < 0{,}5$ нмоль/л).

Эти каналы широко представлены в сенсорных клетках (фоторецепторах, волосковых клетках улитки), эндокринных клетках (включая панкреатические β-клетки, гипофиз, хромаффинные клетки надпочечников, клетки эпифиза), клетках сердца (миокард предсердий, синоатриальный и атриовентрикулярный узлы). Продемонстрирована низкая плотность этих каналов в мембране клеток гладких мышц сосудов. Изучение локализации этого типа каналов у нейронов показало, что они сконцентрированы на близко расположенных дендритах и телах нервных клеток.

Показано, что физиологической функцией $Ca_V1.3$-каналов является секреция нейромедиаторов в сенсорных клетках, контроль сердечного ритма и проводимости атриовентрикулярного узла в покое, синаптическая пластичность и секреция гормонов.

Фармакологическое значение $Ca_V1.3$-каналов заключается в их потенциальной роли в качестве мишени действия лекарственных препаратов-модуляторов сердечного ритма и секреции инсулина.

Мутации приводят к выраженной патологии: это глухота, дисфункция синоатриального и атриовентрикулярного узлов, дефекты секреции инсулина у генетически модифицированных мышей.

Кальциевый канал $Ca_V1.4$. Это наименее изученный канал в группе Ca_V1. Раньше он назывался α_{1F}-кальциевым каналом. Гены

для $Ca_V1.4$-каналов известны у человека (1966aa, O60840, AJ224874, chr. Xp11.23, CACNA1F), крысы (1981aa, AF365975), мыши (1985aa, AF192497).

Связь α_1-субъединицы $Ca_V1.4$-канала с другими субъединицами не установлена. Функциональный анализ этого канала был проведен методами patch-clamp (конфигурации whole-cell, single channel) и визуализацией Ca^{2+} с помощью флюоресцентных меток (calcium imaging). Данные о параметрах тока через этот канал в настоящее время отсутствуют и, следовательно, отсутствуют данные о проводимости, селективности для ионов, процессах активации и инактивации. Активаторы $Ca_V1.4$-канала не установлены. Предполагают, что канал может быть сенситивным к дигидропиридинам (например, BAY K 8644). Ингибиторы воротного механизма также не установлены, но предполагают, что ими могут быть и ингибиторы дигидропиридина. Данные о блокаторах и радиолигандах для $Ca_V1.4$-канала отсутствуют.

Эти каналы распространены в фоторецепторах сетчатки глаза и клетках ганглиев. Показано, что их физиологической функцией является освобождение медиатора в клетках сетчатки глаза. Фармакологическое значение $Ca_V1.4$-каналов не установлено.

Мутации приводят к выраженной патологии. Показано, что мутации вызывают X-связанную врожденную стационарную ночную слепоту второго типа.

9.9. Кальциевые каналы Ca_V2

Кальциевый канал $Ca_V2.1$. Раньше $Ca_V2.1$-канал имел несколько разных названий, которые можно встретить в литературе: α_{1A}, P-type, Q-type, rbA-I (у крыс); BI-1, BI-2 (у кроликов). Гены для $Ca_V2.1$-канала были также изолированы и охарактеризованы у кролика (2273aa, X57476). Скорость инактивации α_{1A}-субъединицы $Ca_V2.1$-канала и V_h по-разному изменяются при коэкспрессии с β_{1b}-, β_{2a}-, β_3- или β_4-субъединицами, так же как и при альтернативном сплайсинге α_{1A}-субъединицы. Whole-cell токи с P-типом кинетики, по-видимому, проводятся при помощи $\alpha_{1A\text{-}b}$-сплайсинговых вариантов, которые коэкспрессированы с любой из β-субъединиц или посредством $\alpha_{1A\text{-}a}$-сплайсинговых вариантов, которые коэкспрессированы с β_{2a}-субъединицей. Токи whole-cell с Q-типом кинетики появляются при кодировании $\alpha_{1A\text{-}a}$, коэкспрессированной с любой β_{1b}-, β_3- или β_4-субъединицей. Токи whole-cell Q-типа, подтвержденные фармакологическим анализом, появляются при кодировании α_{1A}-сплайсинговых вариантов, содержащих Asp Pro-остатки в домене IV связывающего участка S3—S4, в то время как токи whole-cell P-типа, обнаруженные фармакологическим анализом, появляются путем кодирования α_{1A}-сплай-

сингових вариантов, потерявших Asp Pro-остатки в связующем участке S3—S4 домена IV. Гены для $Ca_v2.1$-канала были также изолированы и охарактеризованы у человека (2510aa, AF004883, 2662aa, AF004884, chr. 19p13, CACNA1A), крысы (2212aa, M64373) и мыши (2165aa, NM007578, NP031604).

Было показано, что у $Ca_V2.1$-канала наиболее вероятна связь α_1-субъединицы с $\alpha_2\delta$-, β- и, возможно, γ-субъединицами. Функциональный анализ этого канала был проведен методами фиксации потенциала (voltage clamp), методом patch-clamp, визуализацией Ca^{2+} с помощью флюоресцентных меток (calcium imaging) и посредством изучения освобождения нейротрансмиттера.

В экспериментах было показано наличие $I_{Ca\text{-}P}$, $I_{Ca\text{-}Q}$-тока. Проводимость одиночного канала составляет 9, 14, 19 пСм (Р-тип, клетки Пуркинье мозжечка) и 16—17 пСм (для $\alpha_{1A}/\alpha_2\delta/\beta$ у ооцитов *Xenopus*). При этом селективность для ионов распределяется следующим образом: $Ba^{2+} > Ca^{2+}$. Получены данные, характеризующие процессы активации и инактивации канала. Активация V_a составляет –5 мВ для нативного Р-типа, –11 мВ для нативного Q-типа (с 5 ммоль/л Ba^{2+} в качестве переносчика тока), –4,1 мВ для крысы $\alpha_{1A\text{-}a}/\alpha_2\delta/\beta_4$, +2,1 мВ для крысы $\alpha_{1A\text{-}b}/\alpha_2\delta/\beta_4$ (с 5 ммоль/л Ba^{2+} в качестве переносчика тока), +9,5 мВ, τ_a = 2,2 мс при +10 мВ для человека $\alpha_{1A\text{-}1}/\alpha_2\delta/\beta_{1b}$ в клетках НЕК-293 (с 15 ммоль/л Ba^{2+} в качестве переносчика тока). Инактивация V_h составляет –17,2 мВ для $\alpha_{1A\text{-}a}/\alpha_2\delta/\beta_4$, –1,6 мВ для $\alpha_{1A\text{-}b}/\alpha_2\delta/\beta_4$ (с 5 ммоль/л Ba^{2+} в качестве переносчика тока); –17 мВ, τ_h = 690 мс при +10 мВ для человека $\alpha_{1A\text{-}1}/\alpha_2\delta/\beta_{1b}$ в клетках НЕК-293 (с 15 ммоль/л Ba^{2+} в качестве переносчика тока); τ_h > 1 с при 0 мВ нативного Р-типа (с 5 ммоль/л Ba^{2+} в качестве переносчика тока).

На рис. 9.20, *а* в качестве примера продемонстрирована оригинальная регистрация тока одиночного $Ca_V2.1$-канала. Представлены оригинальные регистрации $Ca_V2.1$-канала в два различных периода, причем величина тока через одиночный канал и проводимость были идентичны в оба периода регистрации. На рис. 9.20, *б* показана зависимость величины тока через одиночный $Ca_V2.1$-канал от амплитуды ступенек деполяризации. Эта зависимость демонстрирует, что проводимость канала не зависит от типа β-субъединицы. На рис. 9.20, *в* показана вероятность открытия P_o как функции потенциала для того же самого одиночного канала при быстрой и медленной инактивации. Активационные кривые получены на основании уравнения Больцмана в следующей форме:

$$P_o = P_{o\max}/[1 + \exp(-(V - V_{0,5})/k)],$$

где $k = RT/zF$.

В этом случае для медленной инактивации $V_{0,5}$ = 34 мв, k = 4,5 мВ, $P_{o\max}$ = 0,64, а для быстрой — $V_{0,5}$ = 29 мВ, k = 6,6 мВ, $P_{o\max}$ = 0,67.

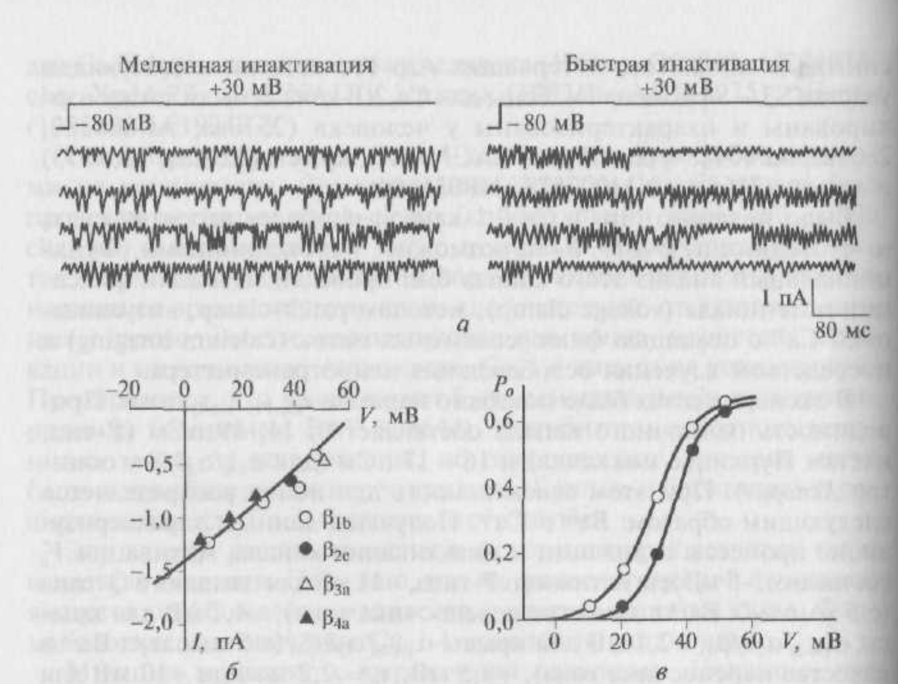


Рис. 9.20. Биофизические свойства $Ca_V2.1$-канала с P/Q-типом Ca^{2+}-тока, зарегистрированного в cell-attached patch у клеток HEK-293:

а — регистрация тока одиночного канала подсемейства $Ca_V2.1$ (тока P/Q-типа) на фоне ступени деполяризации, равной +30 мВ, от поддерживаемого потенциала V_h = –80 мВ. Представлены оригинальные регистрации $Ca_V2.1$-канала в два различных периода. В течение первых 8 мин регистрации канал имел медленную инактивацию, а в течение дальнейших 40 мин регистрации — быструю. Величина тока через одиночный канал и проводимость были идентичны в оба периода регистрации; *б — зависимость величины тока через одиночный* $Ca_V2.1$-канал от амплитуды ступенек деполяризации. Кроме того, показано, что проводимость канала не зависит от типа β-субъединицы; *в* — вероятность открытия P_o как функция потенциала для того же самого одиночного канала при быстрой (белый символ) и медленной инактивации (черный символ)

Активаторы для $Ca_V2.1$-канала неизвестны. Ингибиторами воротного механизма служат ω-агатоксин IVA (P-тип, K_d = 1—3 нмоль/л; Q-тип, K_d ~ 100—200 нмоль/л), ω-агатоксин IVB. К блокаторам относится ω-конотоксин MVIIC. Единственный известный радиоактивный лиганд — *[^{125}I]-ω-конотоксин MVIIC.*

Эти каналы распространены в нейронах (пресинаптические терминали, дендриты, некоторые тела клеток), сердце, поджелудочной железе, гипофизе. Показано, что их физиологической функцией является освобождение нейротрансмиттера в нейронах центральной нервной системы и *мионевральных соединениях;* электросекреторное сопряжение в β-клетках поджелудочной железы.

Пептидные токсины, которые селективно ингибируют $Ca_V2.1$-каналы, блокируют значительную часть синаптической передачи в центральной нервной системе млекопитающих. Блок $Ca_V2.1$-каналов угнетает позднюю фазу ответа на формалиновый тест и боли в результате воспаления, но не оказывают значительного эффекта на механическую аллодинию или термическую гипералгезию. У мышей, не имеющих функционирующего гена $Ca_V2.1$-канала, наблюдаются атрофия мозжечка, тяжелые мышечные судороги и атаксия. Такие животные обычно умирают в течение 3 или 4 недель после рождения.

Мутации приводят к выраженной патологии. Точечные мутации в связывающих участках IS4, IVS6 и IIS5—S6 вызывают семейную гемиплегическую мигрень. Точечные мутации в сегментах S1 и S2 домена III вызывают эпизодическую атаксию типа 2, а добавление глутаминов в С-конец белка — спиноцеребральную атаксию шестого типа. Точечные мутации в сегментах S5—S6 домена I вызывают периодическую и прогрессирующую атаксии.

Кальциевый канал $Ca_V2.2$. Ранее этот канал имел несколько разных названий, которые можно встретить в литературе: N-type, α_{1B}; rbB-I, rbB-II (у крысы), BIII (у кролика). Ген для $Ca_V2.2$-канала был также изолирован и охарактеризован у человека — 2339aa, M94172, 2237aa, M94173, chr. 9q34, CACNA1B, крысы — 2336aa, M92905, мыши — 2329aa, NM007579, NP031605.

Было показано, что у $Ca_V2.2$-канала наиболее вероятна связь α_1-субъединицы с $\alpha_2\delta/\beta_1$-, β_3-, β_4- и, возможно, γ-субъединицей. Функциональный анализ этого канала был проведен методами фиксации потенциала (voltage clamp), patch-clamp, визуализацией кальция с помощью флюоресцентных меток (calcium imaging), посредством изучения освобождения нейротрансмиттера и Ca^{2+}-захвата в синаптосомы.

Проводимость одиночного канала составляет 20 пСм (симпатические нейроны лягушки) или 14,3 пСм (кролик BIII кДНК в миотубулы скелетной мышцы). При этом селективность для ионов распределяется следующим образом: $Ba^{2+} > Ca^{2+}$. Активация V_a составляет +7,8 мВ, τ_a = 3 мс при +10 мВ (человек $\alpha_{1B}/\alpha_2\delta/\beta_{1-3}$ в клетках HEK-293, 15 ммоль/л Ba^{2+} в качестве переносчика тока); +9,7 мВ, τ_a = 2,8 мс при +20 мВ (крыса $\alpha_{1B-II}/\beta_{1b}$, ооциты *Xenopus*, 40 ммоль/л Ba^{2+} в качестве переносчика тока). Инактивация V_h составляет –61 мВ, τ_h около 200 мс при +10 мВ (человек $\alpha_{1B}/\alpha_2\delta/\beta_{1-3}$ в клетках HEK-293, 15 ммоль/л Ba^{2+} в качестве переносчика тока); –67,5 мВ; τ_h = 112 мс при +20 мВ (крыса — $\alpha_{1B-II}/\beta_{1b}$, в ооцитах *Xenopus*, 40 ммоль/л Ba^{2+} в качестве переносчика тока).

На рис. 9.21 в качестве примера показана оригинальная регистрация тока одиночного $Ca_V2.2$-канала (рис. 9.21, *а*) и распределение амплитуды тока при +20 мВ (рис. 9.21, *б*). Амплитуда тока (–1,09 ± 0,02), (–0,89 ± 0,02) и (–0,73 ± 0,02) пА при +10, +20 и

+30 мВ соответственно, а проводимость одиночного канала равна (18,0 ± 1,1) пСм (рис. 9.21, *в*). Распределения времен жизни открытого состояния Ca_V2.3-канала при +20 мВ было аппроксимировано одной экспонентой с τ_0 = 1,04 мс (рис. 9.21, *г*). Среднее время жизни открытого состояния канала, рассчитанное как среднее арифметическое всех данных, было равно (1,14 ± 0,02) мс.

Активаторы для Ca_V2.2-канала неизвестны. Ингибиторы воротного механизма также неизвестны. Блокаторами служат ω-конотоксин GVIA (1—2 мкмоль/л, необратимый блок), ω-конотоксин MVIIA (SNX-111, ziconotide), ω-конотоксин MVIIC. Радиоактивным лигандом является [^{125}I]-ω-конотоксин GVIA (K_d = 55 пмоль/л, у человека $\alpha_{1B}/\alpha_2\delta/\beta_{1-3}$ в клетках HEK-293).

Эти каналы распространены в нейронах (пресинаптические терминали, дендриты, тела клеток). Пептидные токсины, кото-

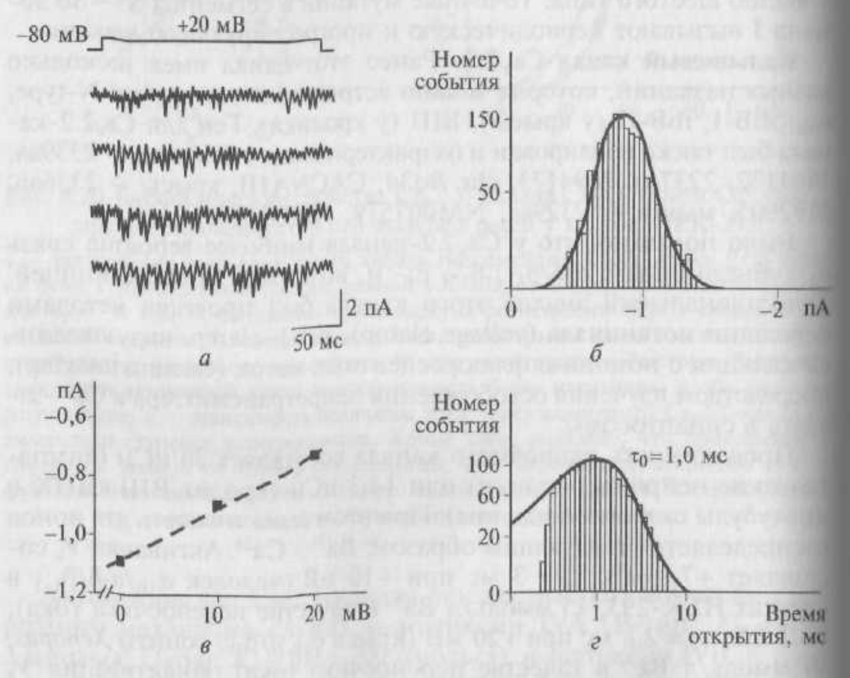


Рис. 9.21. Биофизические свойства Ca_V2.2-канала N-типа Ca^{2+}-каналов кортикальных астроцитов, зарегистрированных в cell-attached patch:

а — регистрация тока одиночного Ca_V2.2-канала (тока N-типа) на фоне ступени деполяризации, равной +20 мВ, от поддерживаемого потенциала V_h = –80 мВ. Раствор в patch-пипетке содержал 5 мкмоль/л нифедипина и 100 нмоль/л SNX-482; *б* — распределение амплитуд тока N-типа при +20 мВ; *в* — наклон кривой — проводимость одиночного канала, рассчитанная по величине зарегистрированного тока N-типа; *г* — гистограмма распределения времен жизни открытого состояния Ca_V2.2-канала при +20 мВ

рые селективно ингибируют каналы N-типа, в значительной степени уменьшают количество освобожденного нейротрансмиттера в периферической и центральной нервной системе млекопитающих.

Эффект действия фармакологических соединений на каналы этого типа заключается в следующем. У крыс введение ω-конотоксина GVIA или ω-конотоксина MVIIA в спинномозговой канал оказывает сильное воздействие на боль в результате воспаления, боль после хирургических вмешательств, тепловое повышение чувствительности к боли и механической аллодинии. У пациентов, не чувствительных к опиатам, введенным в спинномозговой канал, введение в спинномозговой канал SNX-111 (циконотид, синтетический ω-конотоксин MVIIA) значительно уменьшает боли и часто вызывает уменьшение многолетней непрерывной боли.

Мутации приводят к выраженной патологии. Известны сообщения о том, что у мышей с нарушенной функцией $Ca_V2.2$-гена продолжительность жизни не нарушена и они не демонстрируют изменения поведенческих реакций по сравнению с контрольными животными (+/+), однако у этих животных обнаружены увеличение среднего артериального давления и функциональные изменения симпатической нервной системы. Приблизительно $^1/_3$ новорожденных мышей с нарушенной функцией $Ca_V2.2$-гена быстро умирали, но выжившие животные были нормальными, однако у них проявлялись уменьшение беспокойства в поведении, подавление воспалительных реакций и нейропатических болевых ответов. Но о мутации в нативном $Ca_V2.2$-гене до настоящего времени сообщений не было.

Циконотид был исследован на предмет успешного применения в купировании спастичности, вызванной травмами спинного мозга у пациентов, не чувствительных к баклофену и морфию. Побочные эффекты при введении в спинномозговой канал циконотида включают нистагм, седацию, спутанность, слуховые и зрительные галлюцинации, тяжелую ажитацию, неадекватное поведение. Внутривенное введение циконотида людям приводит к значительной ортостатической гипотензии.

Кальциевый канал $Ca_V2.3$. Ранее этот канал имел несколько разных названий, которые можно встретить в литературе: R-тип, α_{1E}, rbE-II (у крысы); BII-1, BII-2 (у кролика).

Ген для $Ca_V2.3$ был также изолирован и охарактеризован: у человека — 2251aa, L29384, 2270aa, L29385, chr. 1q25-q31, CACNA1E; крысы — 2222aa, Genbank L15453; мыши — 2272aa, Q61290.

Было показано, что у $Ca_V2.3$-канала наиболее вероятна связь α_1-субъединицы с $\alpha_2\delta/\beta$ и, возможно, γ-субъединицы. Функциональный анализ этого канала был проведен методами фиксации потенциала (voltage clamp), patch-clamp, визуализацией Ca^{2+} с

помощью флюоресцентных меток (calcium imaging), посредством изучения освобождения нейротрансмиттера.

Проводимость одиночного канала не установлена. Селективность для ионов распределяется следующим образом: Ba^{2+} ~ Ca^{2+} (крыса); $Ba^{2+} > Ca^{2+}$ (человек). Активация V_a составляет +3,5 мВ, τ_a = 1,3 мс при +0 мВ (человек $\alpha_{1E}/\alpha_2\delta/\beta_{1-3}$, 15 ммоль/л Ba^{2+} в качестве переносчика тока в клетках HEK-293); V_a = −29,1 мВ, τ_a = 2,1 мс при −10 мВ (крыса $\alpha_{1E}/\alpha_2\delta/\beta_{1b}$, 4 ммоль/л Ba^{2+} в качестве переносчика тока в ооцитах *Xenopus*). Инактивация V_h составляет −71 мВ; τ_h = 74 мс при 0 мВ (человек $\alpha_{1E}/\alpha_2\delta/\beta_{1-3}$ 15 ммоль/л Ba^{2+} в качестве переносчика тока в клетках HEK-293); −78,1 мВ, τ_h = 100 мс при −10 мВ (крыса $\alpha_{1E}/\alpha_2\delta/\beta_{1b}$, 4 ммоль/л Ba^{2+} в качестве переносчика тока в ооцитах *Xenopus*).

На рис. 9.22 в качестве примера показана оригинальная регистрация тока одиночного $Ca_V2.3$-канала (рис. 9.22, *а*) и распределение амплитуды тока при +20 мВ со средней величиной (−0,81 ± ± 0,01) пА (рис. 9.22, *б*). Амплитуда тока была (−0,92 ± 0,01) и (−0,71 ± 0,01) пА при +10 и +30 мВ соответственно, а проводимость одиночного канала равна (10,5 ± 0,3) пСм (рис. 9.22, *в*). Распределения времени жизни открытого состояния $Ca_V2.3$-канала при +10 мВ было аппроксимировано одной экспонентой с τ_0 = = 0,80 мс (рис. 9.22, *г*). Среднее время жизни открытого состояния канала, рассчитанное как среднее арифметическое всех данных, было равно (0,88 ± 0,02) мс.

Активаторы для $Ca_V2.3$-канала неизвестны. Ингибиторы воротного механизма также неизвестны. Блокаторами служат SNX-482, Ni^{2+} (IC_{50} = 27 мкмоль/л), Cd^{2+} (IC_{50} = 0,8 мкмоль/л). Радиоактивных лигандов нет. Эти каналы распространены в нейронах (тела клеток, дендриты, пресинаптические окончания), сердце, яичках, нейронах гипофиза.

Физиологические функции — освобождение нейротрансмиттера, повторяющаяся взрывная активность нейронов.

Сообщения о точечных мутациях в нативном гене $Ca_V2.3$ отсутствуют. Мыши, у которых инактивирован известный ген, кодирующий $Ca_V2.3$-канал, тем не менее сохраняют токи R-типа в клетках мозжечка. Это позволяет предположить, что токи R-типа действительно отражают гетерогенную смесь каналов. Гомозиготные мыши, потерявшие $Ca_V2.3$, достигают взрослого возраста, способны к размножению, у них отмечают нормальное поведение. Экспериментальные мутантные мыши проявляют увеличенное сопротивление к боли, вызванной формалиновой пробой, предполагая вовлечение $Ca_V2.3$-канала в передачу и/или развитие соматической воспалительной боли.

Как сообщалось разными авторами, ген $Ca_V2.3$-канала кодировал новый Ca^{2+}-канал со свойствами, которые лежат между Ca^{2+}-каналами с высоким и низким порогом, или тип каналов с высо-

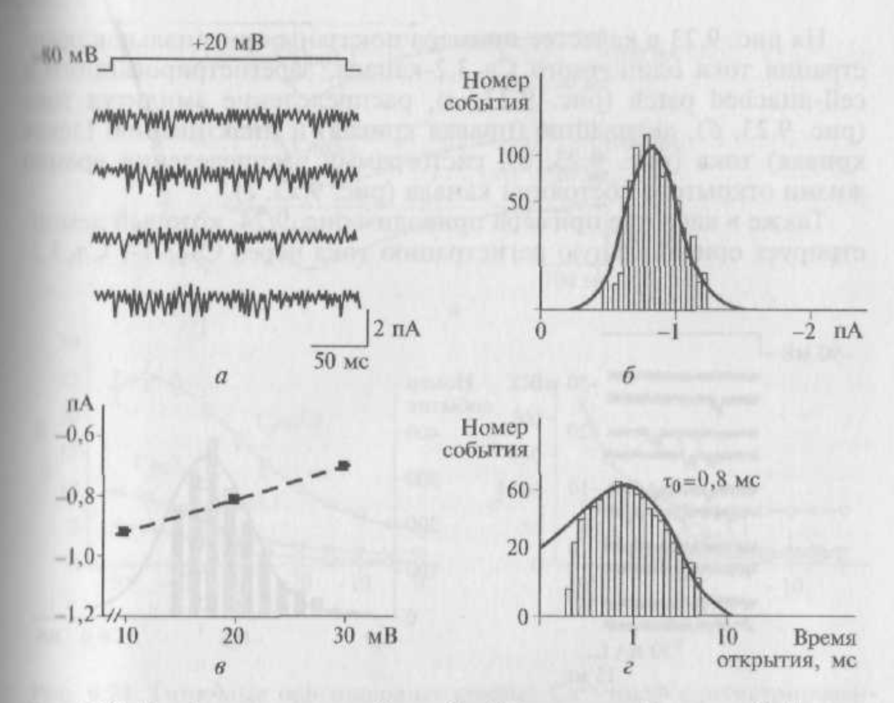


Рис. 9.22. Биофизические свойства $Ca_V2.3$-канала с R-типом Ca^{2+}-тока, зарегистрированного в cell-attached patch у кортикальных астроцитов:

а — регистрация тока одиночного $Ca_V2.3$-канала (тока R-типа) на фоне ступени деполяризации, равной +20 мВ, от поддерживаемого потенциала V_h = –80 мВ. Раствор в patch-пипетке содержал 5 мкмоль/л нифедипина и 10 мкмоль/л CTx-MVIIC. До регистрации в течение 10 мин клетки находились в растворе Тироде, содержащем 3 мкмоль/л CTx-GVIA и 10 мкмоль/л CTx-MVIIC; *б* — распределение амплитуд тока R-типа при +20 мВ; *в* — наклон кривой — проводимость одиночного канала, рассчитанная по величине зарегистрированного тока R-типа; *г* — гистограмма распределения времен жизни открытого состояния $Ca_V2.3$-канала при +10 мВ

ким порогом, не чувствительный к DHPs, ω-агатоксину-IVA и ω-CTx-GVIA и названный R-типом. Токсин тарантула SNX-482 блокирует экзогенно экспрессируемые токи $Ca_V2.3$, но только частично эффективен на нативных токах R-типа клеток мозжечка, предполагая, что $Ca_V2.3$ не всегда проводит значительную часть тока R-типа, как было определено первоначально.

9.10. Кальциевые каналы Ca_V3

Как отмечалось, подсемейство Ca_V3 включает каналы, содержащие α_{1G}-, α_{1H}- и α_{1I}-субъединицы, которые опосредуют Т-тип (низкопороговый, быстроинактивирующийся тип) кальциевых токов.

На рис. 9.23 в качестве примера показаны оригинальная регистрация тока одиночного $Ca_V3.2$-канала, зарегистрированного в cell-attached patch (рис. 9.23, *а*), распределение амплитуд тока (рис. 9.23, *б*), активацию (правая кривая) и инактивацию (левая кривая) тока (рис. 9.23, *в*), гистограмму распределения времен жизни открытого состояния канала (рис. 9.23, *г*).

Также в качестве примера приводим рис. 9.24, который демонстрирует оригинальную регистрацию тока через $Ca_V3.1$-, $Ca_V3.2$-

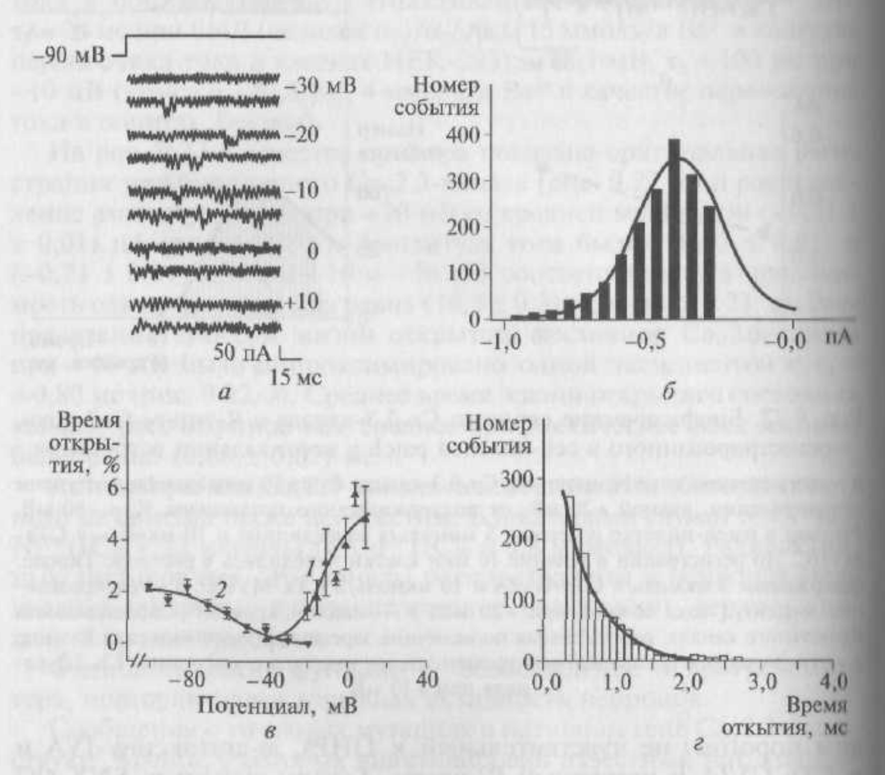


Рис. 9.23. Биофизические свойства канала подсемейства Ca_V3 на примере $Ca_V3.2$-канала с Т-типом Ca^{2+}-тока, зарегистрированного в cell-attached patch у клеток НЕК-293:

а — регистрация тока одиночного $Ca_V3.2$-канала (тока Т-типа) на фоне ступенек деполяризации от поддерживаемого потенциала $V_h = -90$ мВ; *б* — распределение амплитуд тока Т-типа со средней величиной (–0,41 ± 0,01) пА; *в* — исследования активации (кривая *1*) и инактивации (кривая *2*) тока через $Ca_V3.2$-канал. Каждые 2 с от поддерживаемого потенциала величиной –90 мВ подавали деполяризационные ступеньки (для исследования процесса активации канала) или от различных величин поддерживаемого потенциала подавали ступеньку до –10 мВ (для исследования процессов инактивации канала); *г* — гистограмма распределения времен жизни открытого состояния $Ca_V3.2$-канала при тестовом потенциале –10 мВ было аппроксимировано одной экспонентой с $\tau_0 = 0,48$ мс

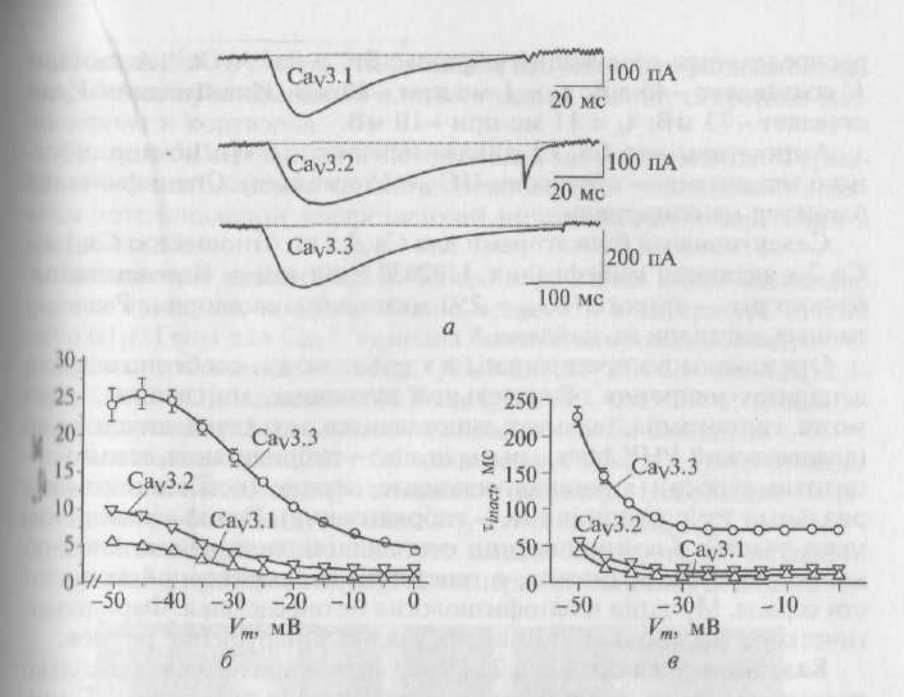


Рис. 9.24. Типичные оригинальные кривые Ca^{2+}-тока, зарегистрированные от $Ca_V3.1$-, $Ca_V3.2$- и $Ca_V3.3$-каналов в конфигурации whole-cell:

а — Ca^{2+}-токи зарегистрированы на фоне ступенек деполяризации до −45 мВ от поддерживаемого потенциала величиной −90 мВ; *б* — активационные кривые для трех типов каналов; *в* — инактивационные кривые для этих же каналов

и $Ca_V3.3$-каналы в конфигурации whole-cell (рис. 9.24, *а*), активацию (рис. 9.24, *б*) и инактивацию (рис. 9.24, *в*) тока для каждого из трех типов каналов.

Детально рассмотрим известные характеристики трех типов каналов подсемейства Ca_V3.

Кальциевый канал $Ca_V3.1$. Ранее $Ca_V3.1$-канал имел несколько разных названий, которые можно встретить в литературе (Т-тип, α_{1G}, $Ca_VT.1$). Гены для $Ca_V3.1$ были изолированы и охарактеризованы: у человека — 2171aa, O43497, NP_061496, chr. 17q22, CACNA1G; крысы — 2254aa, O54898, AAC67372; мыши — 2288aa, Q9WUB8, NP_033913. Были клонированы сплайсинговые варианты, отличающиеся по зависимости от потенциала.

В настоящее время нет биохимических доказательств об изменениях, вызванных ассоциированными с α_1-субъединицей $\alpha_2\delta_1$- и $\alpha_2\delta_2$-субъединицами. Функциональный анализ этого канала был проведен методами фиксации потенциала (voltage clamp) и calcium imaging.

В экспериментах было показано наличие $I_{Ca\text{-}T}$-тока. Проводимость одиночного канала равна 7,5 пСм. Селективность для ионов

распределяется следующим образом: $Sr^{2+} > Ba^{2+} = Ca^{2+}$. Активация V_a составляет –46 мВ; τ_a = 1 мс при –10 мВ. Инактивация V_h составляет –73 мВ; τ_h = 11 мс при –10 мВ.

Активаторы для $Ca_V3.1$-канала неизвестны. Ингибитор воротного механизма — куртоксин (IC_{50} = 15 нмоль/л). Специфический блокатор не обнаружен.

Селективными блокаторами для $Ca_V3.x$ по отношению $Ca_V1.x$ и $Ca_V2.x$ являются мибефрадил, U92032 и пимозид. Неселективные блокаторы — никель (IC_{50} = 250 мкмоль/л), амилорид. Радиоактивных лигандов не найдено.

Эти каналы распространены в клетках мозга, особенно в теле и дендритах нейронов обонятельной луковицы, миндалины, коры мозга, гиппокампа, таламуса, гипоталамуса, мозжечка, ствола мозга (человеческий РНК blots, крысы in situ — гибридизация, и иммуноцитохимически); яичниках, плаценте, сердце (особенно синоатриальный узел; мыши in situ — гибридизация). Эти каналы принимают участие в возникновении осцилляций электрической активности таламуса, возможно, в генерации пейсмейкерной активности сердца. Мутации и патофизиология не определены. Фармакологическоре значение — таламокортикальное нарушение ритмов.

Кальциевый канал $Ca_V3.2$. Ранее этот канал имел несколько разных названий, которые можно встретить в литературе: Т-тип, α_{1H} или $Ca_VT.2$. Гены для $Ca_V3.2$-канала были изолированы и охарактеризованы: у человека — 2353аа, O95180, AAC67239, chr.16p13.3, CACNA1H; крысы — 2359аа, Q9EQ60, AAG35187; мыши — 2365аа, NP_67390.

Ассоциированные субъединицы не установлены. Функциональный анализ этого канала был проведен методами voltage clamp, calcium imaging. В экспериментах было показано наличие $I_{Ca\text{-}T}$–тока. Проводимость одиночного канала равна 9 пСм. Ионная селективность распределяется следующим образом: $Ba^{2+} = Ca^{2+}$. Активация V_a составляет –46 мВ; τ_a = 2 мс при –10 мВ. Инактивация V_h составляет –72 мВ; τ_h = 16 мс при –10 мВ. Активаторы не обнаружены.

Ингибитор воротного механизма — куртоксин. Канал $Ca_V3.2$ более чувствителен, чем $Ca_V3.1$, к блокирующему действию фенитоина и, возможно, амилориду. Селективными блокаторами для $Ca_V3.x$ по сравнению с $Ca_V1.x$ и $Ca_V2.x$ являются мибефрадил, U92032, пимозид, амилорид, никель (IC_{50} = 12 мкмоль/л). Неселективные блокаторы — нимодипин, анестетики. Радиоактивных лигандов не найдено. Эти каналы распространены в почках (у человека), клетках гладких мышц крыс (RT-PCR), в печени (у человека), коре надпочечника (у крысы, быка, in situ — гибридизация и RT-PCR), мозге (особенно обонятельная луковица, полосатое тело, кора мозга, гиппокамп, ядра ретикулярной формации таламуса; крыса in situ — гибридизация) и сердце (особенно синоатриальный узел; мышь in situ — гибридизация).

Показано, что работа этих каналов запускает сокращение гладких мышц, пролиферацию клеток гладких мышц, секрецию альдостерона и кортизола.

Мутации и вызванная ими патология не установлены. Фармакологическое значение каналов заключается в том, что они являются потенциальной лекарственной мишенью при гипертензии и грудной жабе.

Кальциевый канал $Ca_V3.3$. Ранее этот канал имел несколько разных названий, которые можно встретить в литературе (Т-тип либо $\alpha 1_I$). Гены для $Ca_V3.3$-канала были изолированы и охарактеризованы: у человека — 2251aa, Q9UNE6, XP_001125, chr. 22q12.3-13.2, CACNA1I; крысы — 1835aa, Q970Y8, AAD17796; мыши — не клонированы. Были описаны сплайсинговые варианты.

В настоящее время нет биохимических доказательств относительно наличия ассоциированных субъединиц. Небольшие изменения могут быть индуцированы γ_2-субъединицей.

Функциональный анализ этого канала был проведен методами voltage clamp, calcium imaging. В экспериментах было показано на-

Рис. 9.25. Профессор Г. Изенберг (G. Isenberg) (справа), профессоры И. Киселева и А. Камкин в Институте физиологии Университета Halle (Germany), 1999 г. Профессор Г. Изенберг внес огромный вклад в развитие представлений о потенциалуправляемых кальциевых каналах. Представленная на фотографии рабочая группа впервые сформулировала теорию механоэлектрической обратной связи в сердце, базирующуюся на детальном изучении ионных токов через механосенситивные каналы кардиомиоцитов и сердечных фибробластов при растяжении и компрессии клеток и исследовала межклеточное взаимодействие на фоне механических изменений

личие $I_{Ca\text{-}T}$-тока. Проводимость одиночного канала равна 11 пСм. Ионная селективность распределяется следующим образом: Ba^{2+} = Ca^{2+}. Активация V_a составляет –44 мВ; τ_a = 7 мс при –10 мВ. Инактивация V_h составляет –72 мВ; τ_h = 69 мс при –10 мВ. Активаторов не обнаружено.

Не выявлено специфических блокаторов. Селективными блокаторами для $Ca_V3.x$ по сравнению с $Ca_V1.x$ и $Ca_V2.x$ являются мибефрадил, U92032 и пимозид. Неселективный блокатор — никель (IC_{50} = 216 мкмоль/л). Радиоактивных лигандов не найдено.

Эти каналы распространены в мозге, особенно в обонятельной луковице, полосатом теле, коре головного мозга, гиппокампе, ядрах ретикулярной формации, мозжечке (крыса in situ — гибридизация, человек). Показано, что их физиологической функцией являются осцилляции электрической активности таламуса. Мутации и вызванная ими патология не установлены. Фармакологическое значение — таламокортикальное нарушение ритмов.

Неоценимый вклад в развитие представлений о кальциевых каналах, особенно об электрофизиологических свойствах каналов типа Ca_V1, внес наряду с другими учеными профессор Г. Изенберг (G. Isenberg) (рис. 9.25).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Barreiro G. A molecular dynamics study of an L-type calcium channel model / G. Barreiro, C. R. Guimaraes, R.B. de Alencastro // Protein Eng. — 2002. — V. 15. — P. 109—122.

Berrou L. Molecular determinations of inactivation within the I-II linker of α_{1E} ($Ca_V2.3$) calcium channels / L. Berrou, G. Bernatchez, L. Parent // Biophys. J. — 2001. — V. 80. — P. 215—228.

Bezanilla F. The voltage-sensor structure in a voltage-gated channel // TRENDS in Biochemical Sciences. — 2005. — V. 30, № 4. — P. 166 — 168.

Bezanilla F. Voltage sensor movements // J. Gen. Physiol. — 2002. — V. 120. — P. 465—473.

Bezanilla F. Voltage-gated ion channels // IEEE Trans. Nanobioscience. — 2005. — V. 4, № 1. — P. 34 — 48.

Chanda B. Coupling interactions between voltage sensors of the sodium channel as revealed by site-specific measurements / B. Chanda, O. K. Asamoah, F. Bezanilla // J. Gen. Physiol. — 2004. — V. 123. — P. 217—230.

Chanda B. Tracking voltage-dependent conformational changes in skeletal muscle sodium channel during activation / B. Chanda, F. Bezanilla // J. Gen. Physiol. — 2002. — V. 120. — P. 629—645.

Chen Y. H. Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca^{2+} channels // Y. H. Chen, M.H. Li, Y. Zhang et al. // Nature. — 2004. — V. 429. — P. 675—680.

Cuello L. G. Molecular architecture of the KvAP voltage dependent K^+ channel in alipid bilayer / L. G. Cuello, D. M. Cortes, E. Perozo // Science. — 2004. — V. 306. — P. 491—495.

D'Ascenzo M. Electrophysiological and molecular evidence of L-(Ca_V1), N-($Ca_V2.2$), and R-($Ca_V2.3$) type Ca^{2+} channels in rat cortical astrocytes / M. D'Ascenzo, M. Vairano, C. Andreassi et al. // Glia. — 2004. — V. 45. — P. 354—363.

Geib S. The interaction between the I—II loop and the III—IV loop of $Ca_V2.1$ contributes to voltage-dependent inactivation in a beta-dependent manner / S. Geib, G. Sandoz, V. Cornet et al. // J. Biol. Chem. — 2002. — V. 277. — P. 10003—10013.

Gödecke A. Inotropic response to β-adrenergic receptor stimulation and anti-adrenergic effect of ACh in endothelial NO synthase-deficient mouse hearts / A. Gödecke, T. Heinicke, A. Kamkin et al. // J. Physiol. — 2001. — V. 5321. — P. 195—204.

Green P. J. Kinetic modification of the α_{1I} subunit-mediated T-type Ca^{2+} channel by a human neuronal Ca^{2+} channel γ subunit // P. J. Green, R. Warre, P. D. Hayes et al. // J. Physiol. — 2001. — V. 533. — P. 467—478.

Horn R. Coupled movements in voltage-gated ion channels // J. Gen. Physiol. — 2002. — V. 120. — P. 449—453.

Jiang Y. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel / Y. Jiang, A. Lee, J. Chen et al. // Nature. — 2002. — V. 30, № 417(6888). — P. 515—522.

Jiang Y. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K^+ channel / Y. Jiang, V. Ruta, J. Chen et al. // Nature. — 2003. — V. 423. — P. 42—48.

Jiang Y. X-ray structure of a voltage-dependent K^+ channel / Y. Jiang, A. Lee, J. Chen et al. // Nature. — 2003. — V. 423. — P. 33 — 41.

Jones S. W. Calcium Channels: Unanswered Questions // J. Bioenergetics and Biomembr. — 2003. — V. 35, № 6. — P. 461 — 475.

Jurkat-Rott K. The impact of splice isoforms on voltage-gated calcium channel alpha1 subunits // K. Jurkat-Rott, F. Lehmann-Horn // J. Physiol. — 2004. — V. 554. — P. 609—619.

Kim D. Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking α_{1G} T-type Ca^{2+} channels / D. Kim, I. Song, S. Keum et al. // Neuron. — 2001. — V. 31. — P. 35—45.

Kirmse K. Developmental downregulation of low-voltage-activated Ca^{2+} channels in Cajal-Retzius cells of the mouse visual cortex / K. Kirmse, R. Grantyn, S. Kirischuk // Europ. J. Neurosci. — 2005. — V. 21. — P. 3269—3276.

Lacinova L. Gating of the expressed $Ca_V3.1$ calcium channel / L. Lacinova, N. Klugbauer, F. Hofmann // FEBS Lett. — 2002. — V. 531. — P. 235—240.

Larsson H. P. The search is on for the voltage sensor-to-gate coupling // J. Gen. Physiol. — 2002. — V. 120, № 4. — P. 475—481.

Li J. Molecular regions underlying the activation of low- and high-voltage activating calcium channels / J. Li, L. Stevens, N. Klugbauer, D. Wray // Eur. Biophys. J. — 2005. — V. 34. — P. 1017—1029.

Li J. Roles of molecular regions in determining dierences between voltage dependence of activation of $Ca_V3.1$ and $Ca_V1.2$ calcium channels / J. Li, L. Stevens, N. Klugbauer, D. Wray // J. Biol. Chem. — 2004. — V. 279. — P. 26858—26867.

Lipkind G. M. Modeling of the outer vestibule and selectivity filter of the L-type Ca^{2+} channel / G. M. Lipkind, H. A. Fozzard // Biochemistry.— 2001.— V. 40. — P. 6786—6794.

Luvisetto S. Modal gating of human $Ca_V2.1$ (P/Q-type) calcium channels: I The slow and the fast gating modes and their modulation by β subunits / S. Luvisetto, T. Fellin, M. Spagnolo et al. // J. Gen. Physiol. — 2004. — V. 124. — P. 445—461.

MacKinnon R. Voltage sensor meets the lipid membrane // Science.— 2004.— V. 306. — P. 1304—1305.

Opatowsky Y. Structural analysis of the voltagedependent calcium channel beta subunit functional core and its complex with the alpha1 interaction domain / Y. Opatowsky, C. C. Chen, K. P. Campbell, J. A. Hirsch // Neuron. — 2004. — V. 42. — P. 387—399.

Park J. Y. Multiple structural elements contribute to the slow kinetics of the $Ca_V3.3$ T-type channel / J. Y. Park, H. W. Kang, S. W. Jeong, J.H. Lee // J. Biol. Chem. — 2004. — V. 279. — P. 21707—21713.

Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels // Physiol. Rev. — 2003. — V. 83. — P. 117—161.

Ren D. A prokaryotic voltagegated sodium channel / D. Ren, B. Navarro, H. Xu et al. // Science. — 2001. — V. 294. — P. 2372—2375.

Richards M. W. Ca^{2+} channel β-subunits: structural insights AID our understanding / M. W. Richards, A. J. Butcher, A. C. Dolphin // TRENDS Pharmacol. Sci. — 2004. — V. 25(12). — P. 626 — 632.

Rodriguez-Contreras A. Ca^{2+} transport properties and determinants of anomalous mole fraction effects of single voltage-gated Ca^{2+} channels in hair cells from bullfrog saccule / A. Rodriguez-Contreras, W. Nonner, E. N. Yamoah // J. Physiol. — 2002. — V. 538. — P. 729—745.

Rottbauer W. Growth and function of the embryonic heart depend upon the cardiac-specific L-type calcium channel $б_1$ subunit / W. Rottbauer, K. Baker, Z.G. Wo et al. // Dev. Cell. — 2001. — V. 1. — P. 265—275.

Schrier A. D. α_{1H} T-type Ca^{2+} channel is the predominant subtype expressed in bovine and rat zona glomerulosa / A. D. Schrier, H. Wang, E. M. Talley et al. // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. — 2001. — V. 280. — P. C265—C272.

Sheets M. F. The outermost lysine in the S4 of domain III contributes little to the gating charge in sodium channels / M. F. Sheets, D. A. Hanck // Biophys. J. — 2002. — V. 82. — P. 3048—3055.

Sigworth F. J. Voltage-gated ion channels control electrical activity in nerve, muscle and many other cell types. The crystal structure of a bacterial voltage-gated channel reveals the astonishingly simple design of its voltage sensor // Nature. — 2003. — V. 423. — P. 21 — 22.

Starace D. M. A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field / D. M. Starace, F. Bezanilla // Nature. — 2004. — V. 427. — P. 548—552.

Talavera K. Aspartate residues of the Glu-Glu-Asp-Asp (EEDD) pore locus control selectivity and permeation of the T-type Ca^{2+} channel alpha 1G / K. Talavera, M. Staes, A. Janssens et al. // J. Biol. Chem. — 2001. — V. 276. — P. 45628—45635.

Talavera K. Pore structure influences gating properties of the T-type Ca^{2+} channel alpha 1G / K. Talavera, A. Janssens, N. Klugbauer et al. // J. Gen. Physiol. — 2003. — V. 121. — P. 529—540.

ГЛАВА 10

КАЛИЕВЫЕ КАНАЛЫ

10.1. Общая характеристика K^+-каналов

Традиционно K^+-токи и соответственно K^+-каналы были описаны и классифицированы главным образом в возбудимых клетках согласно их функции. Они включали классические:

1) delayed rectifier K^+-channels — K^+-каналы задержанного выпрямления (I_K);

2) fast transient K^+-channels — быстрые транзиторные K^+-каналы выходящего тока (fast transient K^+-current: I_A, или transient outward current I_{to});

3) inward rectifier K^+-channels — K^+-каналы аномального выпрямления с током входящего направления (I_{K1});

4) Ca^{2+}dependent K^+-channels — Ca^{2+}-активируемые K^+-каналы $I_{K(Ca)}$;

5) каналы, через которые осуществляется ток утечки, определяемый преимущественно ионами K^+.

В предыдущих главах мы придерживались для простоты именно такой классификации. Согласно этой классификации быстрые транзиторные K^+-каналы выходящего тока осуществляли проведение быстрого транзиторного выходящего K^+-тока. Эти каналы могут быть активированы только тогда, когда клетка деполяризуется после периода гиперполяризации. В конце первого потенциала действия они инактивированы. Следовая гиперполяризация потенциала действия устраняет их инактивацию, но эти каналы опять открываются только во время фазы деполяризации. Быстрый транзиторный выходящий K^+-ток называется так потому, что ионные каналы, через которые он течет, быстро инактивируются. Каналы, обеспечивающие этот ток, не похожи на все другие потенциалуправляемые ионные каналы, если судить о них по скорости воротного механизма.

Вклад I_A (I_{to}) в электрическую активность особенно значителен у клеток со спонтанной активностью, а также у клеток с низким потенциалом покоя, например у рабочих кардиомиоцитов

потенциал покоя около –90 мВ, что достаточно для устранения инактивации I_A (I_{to}).

Общеизвестно, что проводимость каналов зависит от разности концентраций ионов внутри и снаружи клетки и потенциала мембраны, т.е. электрохимического градиента. В таком случае, предположив, что протекающий через одиночный канал ток лишь незначительно изменяет внутри- и внеклеточную концентрации иона, можно ожидать, что ток, протекающий через канал, линейно зависит от мембранного потенциала. Таким образом, «нормальная» проводимость канала, если бы он был просто порой в клеточной мембране, подразумевает линейную вольт-амперную зависимость. Однако каналы формируются одним или несколькими довольно большими молекулами белков, поэтому их проводимость зависит, как правило, не только от электрохимического градиента иона, но и от свойств молекул, образующих каналы. Поэтому во многих случаях ток, протекающий через них, зависит от мембранного потенциала нелинейно, т.е. вольт-амперная кривая отклоняется от прямой линии. Такое отклонение было названо *аномальным выпрямлением*. Среди K^+-ионных каналов выделяют два различных типа аномальной проводимости.

Во-первых, калиевые каналы аномального выпрямления. К ним относятся outward rectifier K^+-channels, аномальность которых связана с тем, что проводимость этих каналов уменьшается при гиперполяризации и увеличивается при деполяризации, и inward rectifier K^+-channels, аномальность которых связана с тем, что проводимость этих каналов увеличивается при гиперполяризации и уменьшается при деполяризации. Тогда вольт-амперную кривую для outward rectifier K^+-channels можно назвать вольт-амперной кривой аномального выпрямления с током выходящего направления, а для inward rectifier K^+-channels — вольт-амперной кривой аномального выпрямления с током входящего направления.

Во избежание определенного терминологического непонимания очень важно напомнить, что в физиологических условиях, т.е. при тех величинах мембранных потенциалов, которые характерны для клетки, K^+-ток всегда выходящий. Однако при изучении свойств каналов, например их вольт-амперных характеристик, проводят ступенчатое смещение мембранного потенциала от величины поддерживаемого потенциала в область нефизиологических отрицательных (до –100 мВ) и положительных значений (до +100 мВ). Такие выраженные смещения необходимы для того, чтобы охарактеризовать как «поведение» ионных каналов, так и «поведение» токов, протекающих через них. Именно в этих не характерных для клеток диапазонах потенциалов и проявляются отклонения вольт-амперной кривой K^+-каналов от линейности, названные аномальным выпрямлением. Обычно аномальность про-

является, когда мембрану ступенчато гиперполяризуют от уровня потенциала покоя в более отрицательную область вплоть до –100 мВ. Несмотря на нефизиологичность воздействий, различия в «поведении» позволяют *предполагать наличие разных каналов*, т. е. белков, что помогает фармакологам синтезировать вещества, воздействующие специфически на конкретный тип канала.

Таким образом, под inward rectification подразумевается K^+-ток через каналы, работающие как клапан или диод, т. е. в которых предпочтение отдается входу калиевых ионов в клетку и, соответственно, входящему току при искусственном ступенчатом смещении мембранного потенциала от уровня потенциала покоя в сторону гиперполяризации, но не выходу калиевых ионов при деполяризации. Аномальное выпрямление с током входящего направления, отражающее увеличенный вход калиевых ионов под действием электрического тока отрицательной полярности, выражается на вольт-амперной кривой в виде ее большего наклона в области отрицательных потенциалов (более отрицательных, чем величина потенциала покоя). Поскольку выходящий K^+-ток через эти каналы при ступенчатом смещении мембранного потенциала в область отрицательных значений реверсируется на уровне потенциала покоя, где становится входящим, эти токи и были условно названы K^+-токами аномального выпрямления входящего направления, а вольт-амперные кривые — кривыми аномального выпрямления с током входящего направления. Исходно эти токи были обозначены как I_{K1}, а в настоящее время — $I_{K^+_{ir}}$ или I_{Kir}.

Во-вторых, это калиевые каналы задержанного выпрямления. Исходя из названия, можно предположить, что они отвечают на изменения мембранного потенциала не мгновенно. Действительно, эти каналы открываются и тем самым меняют проводимость мембраны с задержкой после ступенчатого смещения потенциала относительно поддерживаемого потенциала. Они закрыты в течение потенциала покоя. При потенциале действия они не препятствуют развитию быстрого входящего Na^+-тока, т. е. фазы деполяризации, и активируются потенциалами, которые преобладают к концу этой фазы. Протекающие через них токи обозначаются как I_K.

Еще один тип K^+-каналов — так называемые Ca^{2+}-активируемые K^+-каналы. Ток через эти каналы обычно обозначается как $I_{K(Ca)}$. Эти достаточно давно описанные ионные каналы включают два подтипа.

Однако на сегодняшний день благодаря успехам молекулярной биологии эта классификация *принципиально устарела*. Именно в рамках этой классификации K^+-каналов и соответствующих им K^+-токов мы излагали те или иные вопросы связи потенциала действия с ионными токами в различных типах клеток. На наш взгляд, как для данного случая, так и применительно к Na^+- и Ca^{2+}-кана-

лам это было оправдано, поскольку вся учебная литература, выпущенная до 2005 г., базируется на этом принципе. Однако в настоящее время новые классификации используют не только в научной литературе, но и учебной литературе, поэтому обсуждение новой спецификации K^+-каналов представляется нам важным.

Чуть больше десятилетия назад была принята первая стандартная номенклатура прежде всего для генов шести трансмембранных сегментов потенциалуправляемых K^+-каналов, названных K_V-системой. Эта номенклатура была основана на выведенных филогенетических связях. Каналы, в составе которых было 65 % идентичных аминокислотных остатков, были объединены в одно подсемейство. Параллельная номенклатура KCN была разработана Human Genome Organisation (HUGO). С тех пор суперсемейство генов K^+-каналов очень расширилось, требуя модификации системы обозначения.

Принятая в настоящее время классификация делит K^+-каналы следующим образом:

1) потенциалуправляемые K^+-каналы (K_V);

2) Ca^{2+}–активируемые K^+-каналы (K_{Ca});

3) inward rectifier K^+-channels — K^+-каналы аномального выпрямления с током входящего направления (K_{ir});

4) two-P K^+-channels — K^+-каналы с двумя петлями в домене (K_{2P}).

Благодаря значительным успехам в биологии современная классификация K^+-каналов основывается на данных молекулярной биологии и гомологии генов. В настоящее время установлен целый ряд генов, который кодирует различные типы K^+-каналов. Первый K^+-канал, у которого была определена последовательность аминокислот, был выделен у *Drosophila* и получил название Shaker по названию генетического мутанта, который имел дефект этого канала. Был идентифицирован и ген, кодирующий этот канал. Стало неожиданностью, что аминокислотная последовательность выделенного белка канала оказалась в 4 раза короче, чем белки Na^+- и Ca^+-каналов. Выделенный белок содержал только один домен, однако далее было показано, что в мембране белки четырех доменов объединяются, формируя K^+-канал, состоящий из четырех доменов. У *Drosophila* были выделены и клонированы еще три типа K^+-каналов — Shab, Shaw и Shal. Каждое из этих подсемейств имеет различные изоформы, однако характерно, что гетеромультимерные K^+-каналы формируют только представителей какой-либо одной изоформы. Так, только четыре изоформы одного и того же подсемейства, например Shaker 1, после эксперессии могут сформировать канал. Аналогично только четыре изоформы Shaker 2 могут сформировать канал.

Позднее было обнаружено, что гены *Drosophila* могут кодировать 12 типов каналов подсемейства Shaker (Shaker 1—12), два

типа каналов подсемейства Shab (Shab 1, 2), четыре типа каналов подсемейства Shaw (Shaw 1, 4) и два типа каналов подсемейства Shal (Shal 1, 2). Забегая вперед, необходимо отметить интереснейший факт: у млекопитающих были обнаружены аналоги всех каналов, выявленных у *Drosophila*. Так, каналы Shaker 1—12 аналогичны каналам K_V1.1. — 1.12, Shab 1—2 аналогичны K_V2.1. — 2.2, Shaw 1—4 аналогичны K_V3.1. — 3.4, а Shal 1—2 аналогичны K_V4.1. — 4.2.

Белки, которые включают в себя шесть трансмембранных сегментов, образуют K_V-каналы, представленные на рис. 10.1. Филогенетические деревья K_V-каналов продемонстрированы на рис. 10.2. Сходным образом организованы родственные им низкопроводящие и среднепроводящие (intermediate-conductance) Ca^{2+}-активируемые K^+-каналы (K_{Ca}), филогенетическое дерево которых показано на рис. 10.3. N- и C-концы этих белков расположены во внутриклеточной среде, а область между пятыми и шестыми трансмембранными сегментами (P-область) формирует пору для проведения ионов. Функционирующий канал сформирован тетрамерной ассоциацией этих 6S/1P-субъединиц.

Второй класс 2S-белков включает три группы каналов — inward rectifiers channels (K_{ir}) (рис. 10.4 и рис. 10.5), которые можно назвать (хотя и очень длинно), как K^+-каналы аномального выпрямления с током входящего направления, $K_{АТФ}$-каналы и K^+-каналы, связанные с G-белком. Два последних типа каналов в настоящей работе не рассмотрены. N- и C- терминали этих каналов также расположены в цитоплазме, P-петля между двумя трансмемб-

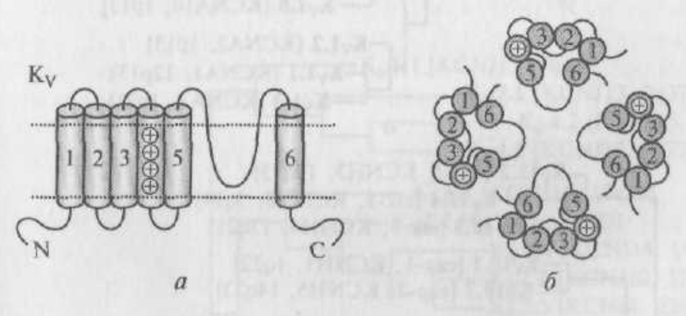
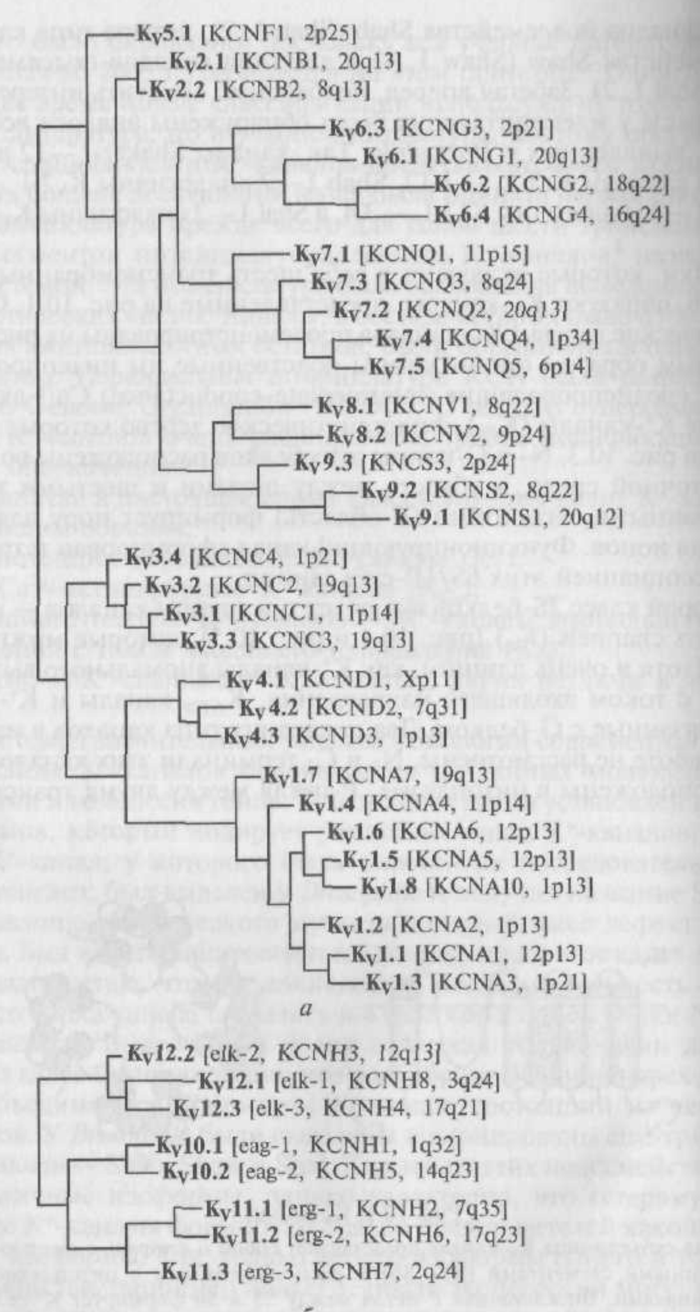


Рис. 10.1. K_V-канал:

а — одна субъединица K_V-канала представляет собой α-спираль с шестью трансмембранными сегментами (S1—S6) и расположенными в цитоплазме N- и C-терминалями. Внеклеточная P-петля между S5 и S6 формирует K^+-селективный фильтр и пору канала, а положительно заряженный S4 формирует сенсор напряжения белка. Длинные N- и C-терминальные петли осуществляют контроль за инактивацией каналов и белок-белковое взаимодействие; *б* — ассоциация четырех субъединиц в K_V-канал



Kv5.1 [KCNF1, 2p25]
Kv2.1 [KCNB1, 20q13]
Kv2.2 [KCNB2, 8q13]
Kv6.3 [KCNG3, 2p21]
Kv6.1 [KCNG1, 20q13]
Kv6.2 [KCNG2, 18q22]
Kv6.4 [KCNG4, 16q24]
Kv7.1 [KCNQ1, 11p15]
Kv7.3 [KCNQ3, 8q24]
Kv7.2 [KCNQ2, 20q13]
Kv7.4 [KCNQ4, 1p34]
Kv7.5 [KCNQ5, 6p14]
Kv8.1 [KCNV1, 8q22]
Kv8.2 [KCNV2, 9p24]
Kv9.3 [KNCS3, 2p24]
Kv9.2 [KCNS2, 8q22]
Kv9.1 [KCNS1, 20q12]
Kv3.4 [KCNC4, 1p21]
Kv3.2 [KCNC2, 19q13]
Kv3.1 [KCNC1, 11p14]
Kv3.3 [KCNC3, 19q13]
Kv4.1 [KCND1, Xp11]
Kv4.2 [KCND2, 7q31]
Kv4.3 [KCND3, 1p13]
Kv1.7 [KCNA7, 19q13]
Kv1.4 [KCNA4, 11p14]
Kv1.6 [KCNA6, 12p13]
Kv1.5 [KCNA5, 12p13]
Kv1.8 [KCNA10, 1p13]
Kv1.2 [KCNA2, 1p13]
Kv1.1 [KCNA1, 12p13]
Kv1.3 [KCNA3, 1p21]
а
Kv12.2 [elk-2, KCNH3, 12q13]
Kv12.1 [elk-1, KCNH8, 3q24]
Kv12.3 [elk-3, KCNH4, 17q21]
Kv10.1 [eag-1, KCNH1, 1q32]
Kv10.2 [eag-2, KCNH5, 14q23]
Kv11.1 [erg-1, KCNH2, 7q35]
Kv11.2 [erg-2, KCNH6, 17q23]
Kv11.3 [erg-3, KCNH7, 2q24]
б

Рис. 10.2. Филогенетические деревья для семейства K_V:

а – филогенетическое дерево для семейства $K_V1 - K_V9$-каналов. Аминокислотные последовательности K_V-канала включают $K_V1 - K_V6$- и $K_V8 - K_V9$-семейства, которые были внесены до 2005 г. Последовательности $K_V7.1 - K_V7.5$, $K_V6.4$ и $K_V8.2$ были добавлены к существующему филогенетическому дереву. Только гидрофобные ядра канала (S1 – S6) использовались для анализа; *б* – филогенетическое дерево для семейств $K_V10 - K_V12$-каналов

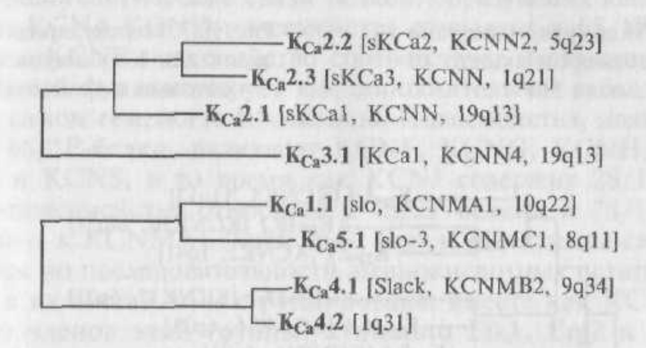
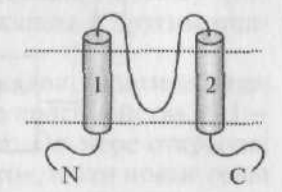


Рис. 10.3. Филогенетическое дерево для K_{Ca}-каналов. Первая группа включает в себя $K_{Ca}2$, $K_{Ca}3$-каналы, вторая – $K_{Ca}1$-, $K_{Ca}4$-, $K_{Ca}5$-каналы. Никакие новые каналы пока еще не были добавлены к этой топологии

Рис. 10.4. Молекулярная организация K^+-каналов аномального выпрямления с током входящего направления (K_{ir})



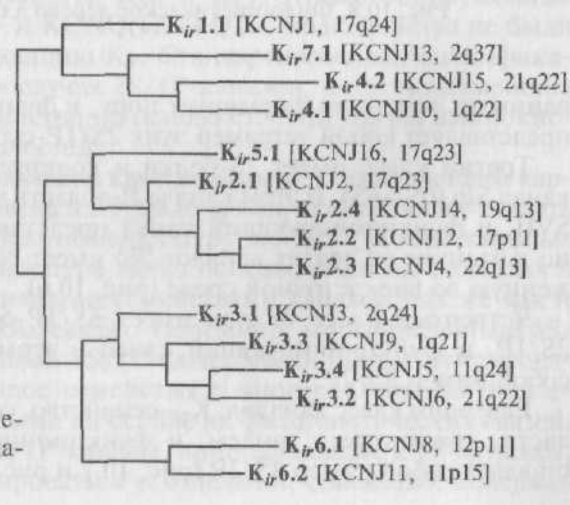


Рис. 10.5. Филогенетическое дерево для K_{ir}-каналов

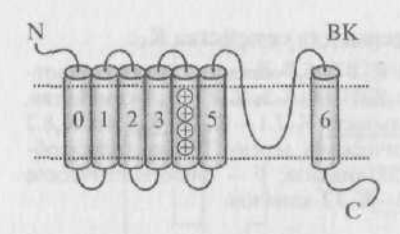


Рис. 10.6. Молекулярная организация высокопроводящего канала Slo

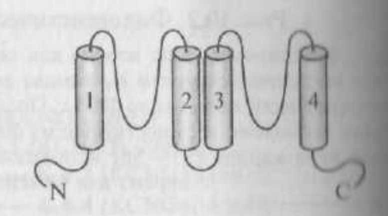


Рис. 10.7. Молекулярная организация для K^+-каналов с двумя петлями в домене (K_{2P})

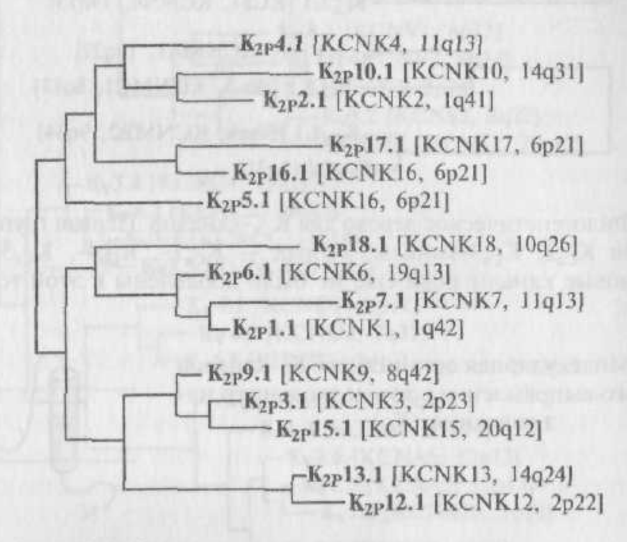


Рис. 10.8. Филогенетическое дерево для K_{2P}-каналов

ранными доменами формирует пору, и функционирующий канал представляет собой тетрамер этих 2S/1P-субъединиц.

Третий класс имеет 7S-белки и кодирует высокопроводящий канал Slo (0S—6S). В этом канале Р-область находится между SVI и SVII, и функционирующий канал представляет собой тетрамер, но в отличие от других каналов Slo имеет N-терминаль, расположенную во внеклеточной среде (рис. 10.6).

Четвертый класс белков имеет 6S/1P-образующий тандем с 2S/1P, и функционирующий канал в этом случае представляет собой димер 8S/2P.

Еще один класс каналов, K_{2P}-семейство, содержит две 2S/1P-области, связанные в тандем, и функционирующий канал представляет собой димер 4S/2P (рис. 10.7 и рис. 10.8).

10.2. Номенклатуры системы K^+-каналов

Номенклатура, предложенная Human Genome Organisation. Недостатком одной из известных номенклатур KCN, предложенной HUGO, является отсутствие какой либо рациональной основы для классификации, особенно то, что она игнорирует структурные и филогенетические связи белков, образующих каналы. Например, KCNA-KCND-подсемейства относятся к 6S/1P-белкам, тогда как KCNE-подсемейство соответствует несвязанному белку, который функционирует как дополнительная субъединица в том же самом семействе K^+-каналов. Подсемейства, кодирующие другие 6S/1P-белки, включают KCNF, KCNG, KCNH, KCNN, KCNQ и KCNS, в то время как KCNJ содержит 2S/1P-белки, KCNK-подсемейство относится к 4S/2P-белкам и 7S/1P-подсемейство — к KCNMA1. Хотя Eag-, Erg- и Elk-каналы сильно отличаются по последовательности аминокислотных остатков, входящих в их состав, они сгруппированы вместе как KCNH. Несколько членов этой группы, а именно Elk1, Erg2 и Erg3, не включены в классификацию HUGO. Точно так же каналы с низкой проводимостью (SKCa1—3) и каналы со средней проводимостью (IKCa1), Ca^{2+}-активируемые K^+-каналы группируются вместе в KCNN-подсемейство даже при том, что они только на 45 % состоят из общих аминокислотных остатков, поэтому лучше было бы рассматривать их как принадлежащие к другим подсемействам.

Стандартная номенклатура системы K^+-каналов. Оригинальная спецификация K_V-каналов, которая включала подсемейства K_V1—K_V6 не обновлялась в течение нескольких лет. По мере открытия новых генов название K_V7 было «перепрыгнуто», и эти новые гены объединены в подсемейства K_V8 и K_V9. Позже обнаруженные KCNH(Eag, Erg, Elk)- и KCNQ(«KVLQT»)-подсемейства не были включены в классификацию K_V. Стандартизованная спецификация была принята для случая 2S/1P-каналов, и эти подсемейства объединили в K_{ir}-семейство на основе степени связей аминокислотных последовательностей.

Обоснование рациональной классификации. С завершением картографии генома человека наступило время, позволяющее создать единую и рациональную номенклатуру для всех K^+-селективных каналов. Такая номенклатура могла основываться на сходствах в структуре между различными семействами каналов, так же как и на их филогенетических связях. Например, многочисленные 6S/1P-белки и единственный 7S/1P-канал могли быть сгруппированы в отдельное большое семейство с многочисленными подсемейстами, определенными на основе их филогенетических связей. Подобным образом 2S/1P-каналы, принадлежащие к 2P-каналам, могли каждый группироваться в отдельное семейство, содержа-

щее многочисленные подсемейства. Стандартизированная спецификация для K^+-каналов, представленных в этом разделе, показана в виде филогенетических деревьев (см. рис. 10.2, 10.3, 10.8). 6S/1P-Каналы были организованы в две отдельные группы на основе их структурного сходства и преобладающих функциональных характеристик, а именно — воротного механизма, управляемого потенциалом (K_V), а также факта, что каналы активируются кальцием (K_{Ca}). Каналы K_{2P} и K_{ir} сходным образом формируют две дополнительные группы. На рис. 10.2, *а* показаны потенциалуправляемые (voltage gated) K^+-*каналы семейств* K_V1-9 *при филогенетической* реконструкции, основанной на сходной аминокислотной последовательности. Среди этой группы только $K_V1.8$ в настоящее время испытывает недостаток в названии HGNC. Пять членов группы K_V, K_V7-семейства (KCNQ1—KCNQ5), в настоящее время могут быть внесенными в союз с другими белками K_V-канала, поэтому не показаны в отдельном филогенетическом дереве, как это представлялось ранее. Оставшиеся семейства K_V10, K_V11 и K_V12 достаточно близко связаны друг с другом, чтобы быть показанными в отдельном филогенетическом дереве (см. рис. 10.2, *б*).

Пять семейств, включающих Ca^{2+}-*сенситивные* K^+-*каналы*, $K_{Ca}1-5$, пронумерованы согласно порядку их открытия и показаны в двух филогенетических деревьях (см. рис. 10.3). Филогенетическая связь между $K_{Ca}1$-, $K_{Ca}4$-, $K_{Ca}5$-группами, с одной стороны и $K_{Ca}2$-, $K_{Ca}3$-группами — с другой, является недостаточно определенной в настоящее время, чтобы объединить их в отдельное филогенетическое дерево.

Группа K^+-каналов — K_{ir} каналы — представлена в филогенетическом дереве на рис. 10.5 с использованием предварительно установленной спецификации и подсемейств.

Наконец, группа K_{2P}-калиевых каналов показана в филогенетическом *дереве на рис. 10.8. Договоренность среди исследователей* в этой области, по-видимому, приведет к созданию более рациональный спецификации в будущем.

10.3. Потенциалуправляемые K^+-каналы

Коротко рассмотрим классификацию, структуру и роль суперсемейства K_V-каналов. До настоящего времени в человеческом геноме были описаны 38 генов, кодирующих членов суперсемейства K_V-каналов. K_V-Каналы попадают в одну из двух классических *категорий delayed rectifier* K^+-*channels* — K^+-*каналы* задержанного выпрямления и fast transient K^+-channels — быстрые транзиторные K^+-каналы выходящего тока (fast transient K^+-current: I_A или transient outward current I_{to}).

Название delayed rectifier K^+-channels было первоначально дано потенциалуправляемым K^+-каналам гигантского аксона кальмара из-за их отсроченной активации (по сравнению с быстро активирующимися Na^+-каналами). Члены всех K_V-подсемейств (включая K_V1-4, EAG и KCNQ) могут формировать delayed rectifier K^+-channels.

Быстрые транзиторные K^+-каналы выходящего тока представляют собой каналы, активируемые низким потенциалом (low voltage-activated). Это быстро инактивирующиеся — транзиторные, т.е. временные, мимолетные K^+-каналы). Каналы этого типа обычно образованы из членов K_V1- и K_V4-подсемейств, а также вспомогательной β-субъединицы, часто необходимой для феномена быстрой инактивации. Недавно была выявлена новая вспомогательная субъединица — CD26, родственная дипептидиламинопептидазаподобному белку (DPPX), что позволило присвоить каналу нейронов характеристику K_V4-каналов.

K_V-Каналы образованы двумя типами белковых субъединиц — α-субъединицами, которые формирует пору, и вспомогательными β-субъединицами. α-Субъединицы формируют тетрамер, чтобы образовать функциональный канал, проводящий ионы K^+.

Субъединица K_V-канала — белок с шестью трансмембранными сегментами (S1—S6), α-спиралями и расположенными в цитоплазме N- и С-терминалями. Наиболее изученными структурами являются внеклеточная Р-петля между S5—S6 (формирует K^+-селективный фильтр и пору канала) и S4, который положительно заряжен и формирует сенсор напряжения белка (см. рис. 10.1). Кроме того, много функций обычно приписывались большим N- и С-концевым петлям. Они включают контроль за инактивацией каналов, взаимодействие между белками (по типу тетрамеризации α-субъединиц), взаимодействие с цитоплазматическими β-субъединицами и сохранение последовательностей.

K_Vα-Субъединицы могут формировать гомотетрамеры (homotetramers) или гетеротетрамеры (heterotetramers), вероятно, ограниченные в том же самом подсемействе. Огромное разнообразие K_V-токов in vivo является следствием существования сплайсинговых вариантов (изоформ гена, кодирующих одну и ту же α-субъединицу), сборки тетрамера α-субъединиц с различными вспомогательными субъединицами и гетеромеризация α-субъединиц.

Как известно, ионы K^+ не эквивалентно распределены между внеклеточной средой и цитоплазмой, что создает движущую силу для выхода ионов K^+ в больших физиологических пределах мембранного потенциала. K_V-Каналы открыты при деполяризации трансмембранного потенциала, что способствует выходу ионов K^+. Деполяризация может быть представлена как аккумуляция позитивных зарядов на внешней стороне мембраны. Однако выход позитивно заряженных ионов, таких как ионы K^+, сдвигает мембран-

ный потенциал ниже потенциала покоя. Таким образом K_V-каналы чувствуют деполяризацию и в свою очередь действуют так, чтобы устранить ее. Одна из наиболее хорошо охарактеризованных ролей K_V-каналов заключается в завершении сильной деполяризации, вызванной активацией потенциалзависимого входа катионов (совместно образующих потенциал действия). Таким образом, можно постулировать, что любые увеличения K_V-канальной активности будут приводить к более эффективному окончанию деполяризации (обычно укорачивая или убирая потенциал действия). Эта функциональная способность K_V-каналов также лежит в основе формирования пачечной (взрывной) активности. Таким образом, активность K_V-каналов играет роль в кодировании информации в нервной системе.

10.4. Ca^{2+}-активируемые K^+-каналы

Вторая большая группа из шести-семи K^+-селективных каналов состоит из K_{Ca}-каналов, представленных на рис. 10.3. Филогенетическое дерево иллюстрирует тот факт, что эти каналы формируют две хорошо определенные, но только отдаленно связанные группы. Одна из этих групп включает три K_{Ca}-канала с низкой проводимостью ($K_{Ca}2.1$, $K_{Ca}2.2$ и $K_{Ca}2.3$) и канал $K_{Ca}3.1$ с промежуточной проводимостью. Эти каналы не являются потенциалуправляемыми и активируются низкими концентрациями внутриклеточного Ca^{2+} (менее 1,0 мкмоль/л) в отличие от $K_{Ca}1.1$ (KCNMA1, Slo1), который активируется и потенциалом, и внутриклеточным Ca^{2+}. Эти три K_{Ca}-канала с низкой проводимостью чувствительны к блокирующему действию апамина (от 100 пмоль/л до 10 нмоль/л), что отличает их от всех других K_{Ca}-каналов. И K_{Ca}-каналы с низкой проводимостью, и каналы с промежуточной проводимостью играют важную роль во многих процессах, включающих Ca^{2+}-зависимый сигналлинг в электровозбудимых и электроневозбудимых клетках. Они не связывают свободные ионы Ca^{2+} непосредственно, а скорее обнаруживают Ca^{2+} через кальмодулин, который постоянно связан с С-терминальным регионом. Связывание кальция с этим кальмодулином приводит к конформационным изменениям, которые являются в свою очередь ответственными за воротный механизм канала.

Филогенетическое дерево, показанное на рис. 10.3, иллюстрирует зависимости последовательностей второй группы K_{Ca}-каналов, которая включает $K_{Ca}1.1$ (Slo или Slo1), $K_{Ca}4.1$ (Slack или Slo2.2), $K_{Ca}4.2$ (Slick или Slo2.1) и $K_{Ca}5.1$ (Slo3). Эти каналы изучали в клетках мозга, улитки и мышцах; известно, что чередующиеся сплайсинги их мРНК ответственны за значительные функциональные различия. В отличие от $K_{Ca}2$- и $K_{Ca}3$-каналов связыва-

ние ионов Ca^{2+} $K_{Ca}1.1$-каналом не зависит от его ассоциации с кальмодулином, но полагают, что определяется по крайней мере тремя связывающими двухвалентные катионы участками в цитоплазматической карбоксильной области каждой субъединицы канала.

Два независимых высокочувствительных Ca^{2+}-связывающих участка, названные calcium bowl, сформированы отрицательно заряженными сегментами в дистальной карбоксильной терминали белка и внутри первой RCK-области, кодирующей проксимальную C-терминаль белка. Третий низкоаффинный связывающий двухвалентные катионы участок также найден в первой RCK-области, которая способствует активации Mg^{2+} и Ca^{2+} при высоких концентрациях (более 1 ммоль/л).

Три других члена этой группы — $K_{Ca}4.1$, 4.2 и 5.2, были все включены в K_{Ca}-спецификацию, так как все они являются членами этой структурно связанной группы генов. Однако в настоящее время о функциональных свойствах членов этого семейства генов известно много больше, чем когда эти наименования только были предложены. Это делает возможным создание спецификации, основанной скорее на функциональном сходстве, чем на структурном. В отличие от найденных членов $K_{Ca}1.1$, которые фактически активируются внутриклеточным Ca^{2+}, ни один из других членов этой группы, по-видимому, не может быть также активирован Ca^{2+}. Фактически, главным образом эти нечувствительные к внутриклеточному Ca^{2+} $K_{Ca}4.2$- и $K_{Ca}4.1$-каналы активируются внутриклеточными ионами Na^{+} и Cl-, а $K_{Ca}5.1$ активизируется внутриклеточным защелачиванием (сдвигом pH в щелочную сторону). Таким образом, хотя они структурно связаны с $K_{Ca}1.1$, эти три канала не могут быть правильно описаны как калиевые каналы, активируемые кальцием на основе функциональных критериев.

10.5. K^{+}-каналы аномального выпрямления с током входящего направления

Клонирование первых inward rectifiers K^{+}-channels — $K_{ir}1.1$ (ROMK1) и $K_{ir}2.1$ (IRK1) — было осуществлено в 1993 г. Последовательность новых членов этого семейства была идентифицирована, включая K-канал, связанный с G-белком — $K_{ir}3$, и АТФ-чувствительный K-канал — $K_{ir}6$. Эти каналы играют важную физиологическую роль в функции многих органов, включая мозг, сердце, почки, эндокринные клетки, слуховые клетки и клетки сетчатки. Молекулярная организация этих каналов приведена на рис. 10.4. Филогенетическое дерево, показанное на рис. 10.5, иллюстрирует родственные связи, основанные на последовательно-

сти *аминокислотных остатков, между семью основными* подсемействами K_{ir}. В настоящее время новые члены этого семейства не были идентифицированы. Поскольку это филогенетическое дерево появилось лишь в 2002 г. в издании «IUPHAR», маловероятно, что какие-либо другие новые члены были обнаружены за этот период.

В последнее время метод рентгеноструктурной кристаллографии дал возможность описать структуру цитоплазматического региона $K_{ir}3.1$, полную структуру бактериальных $K_{ir}1.1$ и цитоплазматическую область $K_{ir}2.1$. Эти данные демонстрируют, что inward rectifiers K^+-channels имеют длинную пору, уходящую в цитоплазму, и подчеркивают важность отрицательных зарядов аминокислотных остатков на стенке цитоплазматической части поры, которая играет важную роль аномального выпрямления. Эти исследования обеспечили понимание механизмов регулирования ворот канала посредством лигандов через G-белки и фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат.

Информация, полученная благодаря анализу кристаллической структуры, чрезвычайно ценна, так как позволяет оценить структурно-функциональные отношения. Примечательны также изучения, посвященные изучению динамических аспектов функции канала.

10.6. K^+-каналы с двумя петлями в домене

Менее чем десятилетие назад были открыты K_{2P}-каналы. Их изучение показало, что базовая утечка ионов K^+ через специализированные пути представляет собой эффективно регулируемый механизм контроля возбудимости клеток. Пути утечки ионов K^+, активные в покое, стабилизируют мембранный потенциал ниже порога генерации взрывной (пачечной) активности и ускоряют реполяризацию. Хотя существование токов утечки предположили в 1952 г. А.Л.Ходжкин и А.Ф.Хаксли, они остались биофизическим курьезом в течение пяти десятилетий.

Идентификации первых молекулярных механизмов тока утечки ионов K^+ способствовало клонирование K^+-каналов с двумя пороформирующими петлями в каждой субъединице и четырьмя (или восемью) трансмембранными сегментами в *Saccharomyces cerevisiae* и *Caenorhabditis elegans*. После этого K_{2P} был изолирован из нервно-мышечной ткани *Drosophilla melanogaster*. Биофизические характеристики показали, что K_{2P} должен быть K^+-селективным каналом с определенными параметрами проводимости, т.е. с потенциалнезависимым воротным механизмом и предсказанным Б.Гольдманом, А.Л.Ходжкиным и Б.Катцом выпрямлением. Когда концентрация ионов K^+ симметрична с двух сторон

мембраны, K_{2P}-токи демонстрируют линейную зависимость от потенциала. При физиологических условиях (высокая концентрация ионов K^+ внутри и низкая снаружи) K_{2P} проводит более значительный ток из клетки, чем внутрь клетки. Наблюдается поток ионов, направленный в большей степени наружу, чем внутрь клетки.

Поразительная черта K_{2P}-каналов — организация их субъединицы (см. рис. 10.7). Каждая имеет две Р-петли и четыре S-сегмента. Эта отличающаяся топология (2P/4S) может быть найдена в более чем 70 предсказанных гомологах в базе данных, полученных при изучении генома. Пятнадцать генов млекопитающих в семействе обозначены как KCNK-гены, кодирующие K_{2P}-каналы (см. рис. 10.8).

Легко обнаруживается функция ионного канала при экспрессии. Как ожидалось для регуляторов возбудимости, K_{2P}-каналы находятся под сильным контролем множества химических и физических стимулов, включая напряжение кислорода, pH, липиды, механическое растяжение, нейротрансмиттеры и рецепторы, связанные с G-белком. Каналы являются также молекулярными мишенями для некоторых летучих и местных анестетиков. Регуляция K_{2P}-каналов связана с изменениями в их свойствах, например вероятности открытия каналов. Тем не менее некоторые регуляторные изменения, например фосфорилирование K_{2P2}, обеспечивает появление выпрямляющих свойств с чувствительностью к потенциалу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Bao L. Elimination of the BKCa channel's high-affinity Ca^{2+} sensitivity / L. Bao, A. M. Rapin, E. C. Holmstrand, D. H. Cox // J. Gen. Physiol. — 2002. — V. 120. — P. 173—189.

Bichet D. Merging functional studies with structures of inward rectifier K^+ channels / D. Bichet, F. A. Haass, L. Y. Jan // Nat. Rev. Neurosci. — 2003. — V. 4. — P. 957—967.

Bockenhauer D. KCNK2: reversible conversion of ahippocampal potassium leak into a voltage-dependent channel / D. Bockenhauer, N. Zilberberg, S. A. Goldstein // Nat. Neurosci. — 2001. — V. 4. — P. 486—491.

Chandy K. G. A simplified gene nomenclature // Nature. — 1991. — V. 352. — P. 26.

Connors N. C. The potassium channel $K_{ir}4.1$ associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia / N. C. Connors, M. E. Adams, S. C. Froehner, P. Kofuji // J. Biol. Chem. — 2004. — V. 279. — P. 28387—28392.

Cox D. H. The BKCa channel's Ca^{2+}-binding sites, multiple sites, multiple ions // J. Gen. Physiol. — 2005. — V. 125. — P. 253—255.

Doupnik C. A. The inward rectifier potassium channel family / C. A. Doupnik, N. Davidson, H. A. Lester // Curr. Opin. Neurobiol. — 1995. — V. 5. — P. 268—277.

Faber E. S. L. Calcium-activated potassium channels: multiple contributions to neuronal function / E. S. L. Faber, P. Sah // Neuroscientist. — 2003. — V. 9. — P. 181—194.

Fanger C. M. Calmodulin mediates calciumdependent activation of the intermediate conductance K_{Ca} channel, $IK_{Ca}1$ / C. M. Fanger, S. Ghanshani, N. J. Logsdon et al. // J. Biol. Chem. — 1999. — V. 274. — P. 5746—5754.

Gloyn A. L. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit $K_{ir}6.2$ and permanent neonatal diabetes / A. L. Gloyn, E. R. Pearson, J. F. Antcliff et al. // N. Engl. J. Med. — 2004. — V. 350 — 351. — P. 1838—1849, 1470.

Goldstein S. A. Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits / S. A. Goldstein, D. Bockenhauer, I. O'Kelly, N. Zilberberg // Nat. Rev. Neurosci. — 2001. — V. 2. — P. 75—84.

Goldstein S. A. ORK1, a potassiumselective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila* melanogaster by expression in *Saccharomyces cerevisiae / S. A. Goldstein, L. A. Price, D. N. Rosenthal, M. H. Pausch // Proc.* Natl. Acad. Sci. USA. — 1996. — V. 93. — P. 13256—13261.

Gutman G. A. Nomenclature for vertebrate voltage-gated K^+ channels / G. A. Gutman, K. G. Chandy // Sem. Neurosci. — 1993. — V. 5. — P. 101—106.

Ishii T. M. A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel / T. M. Ishii, C. Silvia, B. Hirschberg et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1997. — V. 94. — P. 11651—11656.

Jerng H. H. Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels / H. H. Jerng, P. J. Pfaffinger, M. Covarrubias // Mol. Cell. Neurosci. — 2004. — V. 27. — P. 343—369.

Joiner W. J. Formation of intermediate-conductance calciumactivated potassium channels by interaction of Slack and Slo subunits / W. J. Joiner, M. D. Tang, L. Y. Wang et al. // Nat Neurosci. — 1998. — V. 1. — P. 462—469.

Joiner W. J. hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels / W. J. Joiner, L. Y. Wang, M. D. Tang, L. K. Kaczmarek // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1997. — V. 94. — P. 11013—11018.

Ketchum K. A. A new family of outwardly-rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem / K. A. Ketchum, W. J. Joiner, A. J. Sellers et al. // Nature (Lond.). — 1995. — V. 376. — P. 690—695.

Kohler M. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain / M. Kohler, B. Hirschberg, C. T. Bond et al. // Science. — 1996. — V. 273. — P. 1709—1714.

Kubo Y. K_{ir} potassium channels / Y. Kubo, J. P. Adelman, D. E. Clapham et al. // The IUPHAR Compendium of Voltage-gated Ion Channels / ed. by W. A. Catterall, K. G. Chandy, G. Gutman. — Leeds : IUPHAR Media, 2002. — P. 153—172.

Kuo A. Crystal structure of the potassium channel $K_{ir}Bac1.1$ in the closed state / A. Kuo, J. M. Gulbis, J. F. Antcliff et al. // Science (Wash. DC). — 2003. — V. 300. — P. 1922—1926.

Lesage F. Molecular and functional properties of two-poredomain potassium channels / F. Lesage, M. Lazdunski // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. — 2000. — V. 279. — P. F793—F801.

Lingle C. J. Setting the stage for molecular dissection of the regulatory components of BK channels // J. Gen. Physiol. — 2002. — V. 120. — P. 261—265.

Magleby K. L. Gating mechanism of BK (Slo1) channels: so near, yet so far // J. Gen. Physiol. — 2003. — V. 121. — P. 81—96.

Misonou H. Determinants of voltage-gated potassium channel surface expression and localization in mammalian neurons / H. Misonou, J. S. Trimmer // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. — 2004. — V. 39. — P. 125—145.

Moczydlowski E. G. BK channel news: full coverage on the calcium bowl // J. Gen. Physiol. — 2004. — V. 123. — P. 471—473.

Nishida M. Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G-protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 A resolution / M. Nishida, R. MacKinnon // Cell. — 2002. — V. 111. — P. 957—965.

Norton R. S. Potassium channel blockade by the sea anemone toxin ShK for the treatment of multiple sclerosis and other autoimmune diseases / R. S. Norton, M. W. Pennington, H. Wulff // Curr. Med. Chem. — 2004. — V. 11. — P. 3041—3052.

Pegan S. Cytoplasmic domain structures of $K_{ir}2.1$ and $K_{ir}3.1$ show sites for modulating gating and rectification / S. Pegan, C. Arrabit, W. Zhou et al. // Nat. Neurosci. — 2005. — V. 8. — P. 279—287.

Riven I. Conformational rearrangements associated with the gating of the G protein-coupled potassium channel revealed by FRET microscopy / I. Riven, I. Kalmanzon, L. Segev, E. Reuveny // Neuron. — 2003. — V. 38. — P. 225—235.

Schreiber M. Slo3, a novel pH-sensitive K^+ channel from mammalian spermatocytes / M. Schreiber, A. Wei, A. Yuan et al. // J. Biol. Chem. — 1998. — V. 273. — P. 3509— 3516.

Schreiber Mand Salkoff L. A novel calcium-sensing domain in the BK channel // Biophys. J. — 1997. — V. 73. — P. 1355—1363.

Schumacher M. A. Structure of the gating domain of a Ca^{2+}-activated K^+ channel complexed with Ca^{2+}/calmodulin / M. A. Schumacher, A. F. Rivard, H. P. Bachinger, J. P. Adelman // Nature (Lond.). — 2001. — V. 410. — P. 1120—1124.

Shi J. Mechanism of magnesium activation of calcium-activated potassium channels / J. Shi, G. Krishnamoorthy, Y. Yang et al. // Nature (Lond.). — 2002. — V. 418. — P. 876—880.

Stanfield P. R. Constitutively active and G protein coupled inward rectifier K^+ channels: $K_{ir}2.0$ and $K_{ir}3.0$ / P. R. Stanfield, S. Nakajima, Y. Nakajima // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. — 2002. — V. 145. — P. 47—179.

Stocker M. Ca^{2+}-activated K^+ channels: molecular determinants and function of the SK family // Nat. Rev. Neurosci. — 2004. — V. 5. — P. 758—770.

The IUPHAR Compendium of Voltage-gated Ion Channels / ed. by W. A. Catterall, K. G. Chandy, G. A. Gutman. — Leeds : IUPHAR Media, 2002.

Weiger T. M. Modulation of calcium-activated potassium channels / T. M. Weiger, A. Hermann, I. B. Levitan // J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol. — 2002. — V. 188. — P. 79—87.

White J. A. Guidelines for Human Gene Nomenclature // Genomics. — 1997. — V. 45. — P. 468—471.

Wua Y. J. Recent developments on KCNQ potassium channel openers / Y. J. Wua, S. I. Dworetzky // Curr. Med. Chem. — 2005. — V. 12. — P. 453—456.

Xia X.M. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels / X. M. Xia, B. Fakler, A. Rivard et al. // Nature (Lond.). — 1998. — V. 395. — P. 503—507.

Xia X.M. Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels / X. M. Xia, X. Zeng, C. J. Lingle // Nature (Lond.). — 2002. — V. 418. — P. 880—884.

Yuan A. The sodium-activated potassium channel is encoded by a member of the Slo gene family / A. Yuan, C.M. Santi, A. Wei et al. // Neuron. — 2003. — V. 37. — P. 765—773.

ГЛАВА 11

МЕХАНОСЕНСИТИВНОСТЬ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

11.1. Механосенситивные ионные каналы

11.1.1. Силы, вовлеченные в изменение состояния МСК

Чтобы понять работу МСК, необходимо представить все силы, вовлеченные в изменение состояния этих каналов, и принципы возникновения этих сил при том или ином воздействии на мембрану. В попытке определить величину оцениваемых сил, вовлеченных в изменение состояния МСК, возможно описывать среднюю силу F на канале, умножая его периметр на натяжение мембраны. Типичное натяжение мембраны в 1 дин/см для достижения полуактивации МСК диаметром 5 нм демонстрирует величину $F = 2\pi rT$, равную 15,7 пН.

Достаточно трудно измерить силы, которые активируют МСК в клеточных мембранах, так как мембраны состоят из параллельных и перекрещивающихся компонентов, включающих внеклеточный матрикс, липидный бислой и цитоскелет. Эксперименты, выполненные на везикулах при помощи метода patch-clamp в конфигурации whole-cell, показывают, что МСК может быть полуактивирован при среднем натяжении мембраны в диапазоне 1 дин/см. Однако некоторые МСК, типа недавно клонированного бактериального МСК — MscL, могут требовать намного большего значения.

Поскольку относительно недавно некоторые МСК были встроены в липидный бислой, появилась возможность более точной оценки зависимости активации МСК в этих системах от величины натяжения мембраны, но это еще не сделано. Принципиальная демонстрация закрытого/открытого перехода МСК в липидном бислое представлена на рис. 11.1. Натяжение мембраны уменьшает плотность липидов и приводит к изменению конформации канала.

Открытый канал больше, чем закрытый, настолько, чтобы при натяжении величина работы, выполненной на канале при его переходе от закрытого состояния в открытое, равнялась $T\Delta A$, при этом:

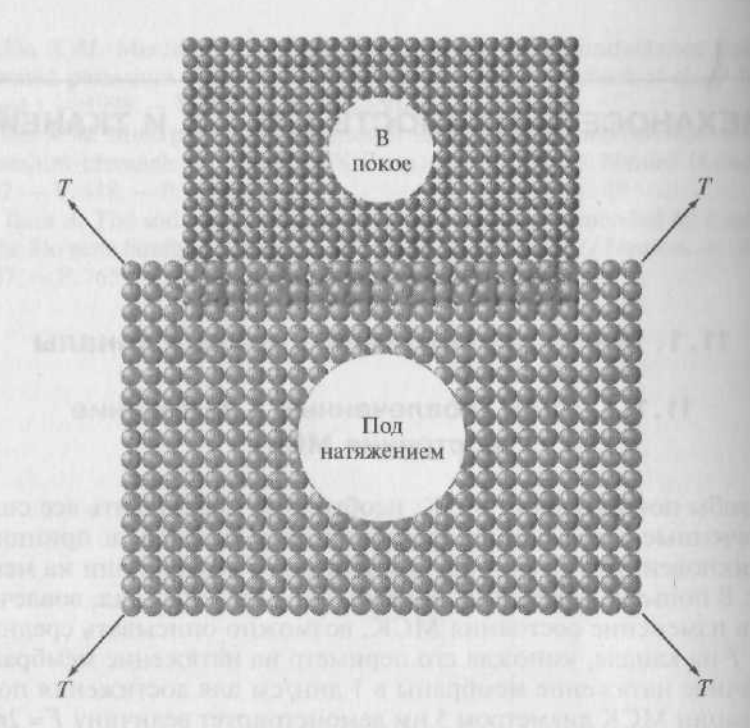


Рис. 11.1. Демонстрация SAC в липидном бислое в отсутствие и под действием натяжения мембраны (T). При натяжении бислойная решетка расширяется. Расширение области липидного слоя обычно составляет менее 3 %

$$\Delta A = 8\pi\left(r_o^2 - r_c^2\right),$$

где r_o^2, r_c^2 — радиусы открытого и закрытого канала соответственно.

Необходимо отметить, что у эукариотных клеток механический стресс распространяется не только в плоскости мембраны, поскольку и цитоскелет, и, возможно, непосредственно сами каналы могут демонстрировать силы, направленные и перпендикулярно к мембранной поверхности.

11.1.2. Бислой

Свойства бислоя. Чтобы определить основные элементы мембранной механики, *необходимые для обсуждения приведенных* проблем, связанных с работой МСК, нужно рассмотреть липидный бислой. *Липидный бислой* — это двумерная жидкость, характеризующаяся тремя свойствами, или механическими параметрами: со-

противлением увеличению площади бислоя, сопротивлением изгибу и сопротивлением изменению формы данной области.

Сопротивление увеличению площади бислоя, или сопротивление растяжению, характеризуется константой эластичности K_A. Она определена формулой

$$T = \frac{\Delta A}{A} K_A,$$

где A — исходная площадь; ΔA — увеличение площади при натяжении мембраны величиной T.

Бислой имеет относительно высокое сопротивление растяжению (K_A = 100—1 000 дин/см), причем возможность расширения его площади равна 3—5 % в зависимости от состава.

Сопротивление изгибу, которое определяется через момент изгиба M:

$$M = k_c \Delta(1/r_1 + 1/r_2),$$

где r — основной радиус кривизны; k_c — жесткость изгиба.

Бислой изгибается легко ($k_c \approx 10^{-12}$ дин/см), если натяжение невысокое. Из-за низкой жесткости изгиба недеформированная мембрана под влиянием тепловой энергии колеблется в направлении, перпендикулярном по отношению к своей плоскости. Такие режимы колебания наблюдаются в красных клетках при их нормальном объеме. Эти поверхностные волны действуют как энтропические скачки, которые уменьшают примерно до 20 % теоретическую эластичность, связанную с уменьшением плотности липидов при натяжении.

Изгибающие колебания всегда присутствуют и их амплитуда уменьшается при средней величине натяжения. При значениях натяжения более чем 10^{-3} дин/см колебания меньше, чем длина волны света, и, следовательно, вообще неразличимы.

Третье свойство бислоя — сопротивление изменению формы данной области. Поскольку бислой — жидкость, этот параметр равен нулю при равновесии, но из-за текучести мембраны соответствующая вязкость может быть существенной.

Активация МСК при натяжении мембраны. В литературе представлено достаточное количество работ, в которых продемонстрированы модели, анализирующие вероятность открытия МСК (P_o) в зависимости от величины натяжения мембраны. Не детализируя этот вопрос, приведем две сходные модели, чтобы читатель получил представление о путях анализа этого вопроса.

Ранние модели механосенситивного воротного механизма связаны с применением закона Гука для эластических элементов мембраны с результатом, что свободная энергия ворот канала была зависима от площади мембраны при создании натяжения. Эти

проанализированные модели предсказывают сигмоидальную зависимость, аналогичную следующей:

$$P_o = \frac{P_{max}}{1 + K\exp\left[-\theta T^2\right]},$$

где K — независимая от давления константа; θ — чувствительность мембраны к растяжению; T — приложенное к мембране натяжение.

Хотя уравнение имеет империческую основу, обычно возможно получить хорошее совпадение для параметров K и θ, подразумевающих, что зависимость T^2 неполная.

Лучшая демонстрация вероятности достижения открытого состояния канала может быть получена путем представления, что свободная энергия, обеспечивающая воротный механизм, линейная (скорее, чем квадратичная) и связана с натяжением мембраны T. Вероятность открытия канала P_o все еще будет сигмоидальной функцией натяжения, но кривая будет иметь слегка другую форму и подчиняться уравнению

$$P_o = \frac{P_{max}}{1 + k_{eq}\exp\left[\frac{-T\Delta A - qV}{kT_k}\right]},$$

где k_{eq} — константа равновесия для открытия канала в отсутствие растяжения; ΔA — увеличение плоскостной площади канала на фоне открытия (где $\Delta A > 0$); q — суммарный воротный заряд, движущийся через электрическое поле при открытии канала ($q > 0$); k — константа Больцмана; T_k — абсолютная температура (по Кельвину).

Лучшая презентация — действительно та, которая включает обе (линейную и квадратичную) зависимости от натяжения мембраны T; линейность вытекает из изменений в площади канала, ассоциирующейся с открытием, а квадратичная зависимость вытекает из эластической энергии, сохраняемой каналом.

При любом подходе к моделированию активации МСК при натяжении мембраны в наиболее простом виде МСК представляются как бистабильные активируемые объекты. Активация подразумевает, что энергия канала превышает барьер(ы), отделяющий открытое состояние от закрытого. Канал без задержки раскрывается приложением силы.

Вероятность нахождения канала в открытом состоянии определяется приложенной силой, потому что глубина энергетических уровней, соответствующая закрытым и открытым состояниям, зависит согласно распределению Больцмана от приложенной силы.

Работа, произведенная над областью сенсора канала при натяжении мембраны (или силы), была бы порядка $T\Delta A$, где ΔA — различие в плоскостной площади между закрытым и открытым состояниями канала. Эта модель исследует конкретно канал, активируемый растяжением.

Канал SAC должен иметь больший размер сенсора, когда открыт, чем когда закрыт. Изменение в размерах может быть оценено, исходя из анализа процесса открытия/закрытия. Рассмотрим два состояния канала $c \rightleftharpoons o$ (закрытый $\rightleftharpoons$ открытый). В отсутствие натяжения мембраны вероятность закрытого или открытого состояния канала соответственно $P_c(0)$ или $P_o(0)$. В присутствии натяжения T эти вероятности станут $P_c(T)$ и $P_o(T)$. Из уравнения Больцмана следует:

$$P_o(T)/P_c(T) = e^{-\Delta G(T)/k_BT}, \qquad (11.1)$$

где $\Delta G(T)$ — разность свободных энергий $G_o - G_c$ между o и c при натяжении T.

Для описываемого канала с двумя состояниями $P_c = 1 - P_o$, и

$$P_o(T) = 1/(1 + e^{\Delta G(T)/k_BT}).$$

За основу берется наиболее простая модель для $\Delta G(T)$ — закон Гука для области

$$\Delta G(T) = \Delta G(0) - T\Delta A = (T_o - T)\Delta A,$$

где $\Delta G(0)$ — разница энергии между открытым и закрытым состояниями при натяжении, равном нулю; T_o — нулевая величина натяжения; ΔA — временное изменение в площади между открытым и закрытым состояниями.

Таким образом, уравнение (11.1) можно представить как

$$P_o(T) = 1/(1 + e^{\Delta A(T-T_0)/k_BT}),$$

что и продемонстрировано на рис. 11.2. Максимальный наклон, который происходит в точке изгиба при T_0, является равным $\Delta A/4k_BT$. Если P_o измерено как функция натяжения, тогда максимальный наклон может использоваться, чтобы вывести ΔA — изменение в площади между закрытым и открытым состояниями.

Оценка истинного наклона кривой получается на основе информации о P_o при двух различных значениях натяжения (например, T_1 и T_2). Как показывает наклон прямой линии на рис. 11.2, он всегда меньше, чем истинный наклон, но может использоваться для определения нижнего предела свободной энергии, которая может быть приложена к каналу. Уравнение (11.1) может быть решено для ΔG в присутствии двух различных стимулов, отмеченных *1* и *2*. Для системы с двумя состояниями разница сво-

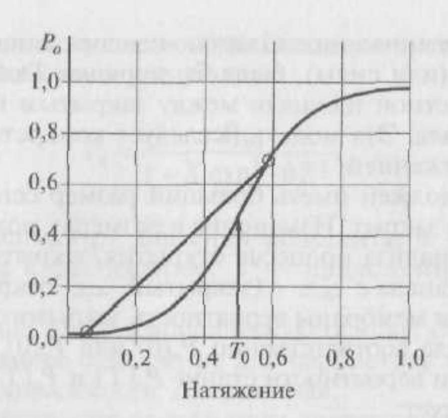


Рис. 11.2. Вероятность существования открытого состояния канала по отношению к натяжению для двух состояний канала. Распределение Больцмана рассчитано для $T_0 = 0{,}5$ и $\Delta A/k_B T = 10$. Наклон кривой рассчитан по двум точкам, отмеченным кружками

бодных энергий между открытым и закрытым состояниями составляет

$$\Delta G_{12} = k_B T \ln[(1/P_o(2) - 1)/(1/P_o(1) - 1)].$$

Если вероятность открытого состояния канала в покое составляет 10^{-3}, а вероятность нахождения канала в открытом состоянии при стимуляции приближается к единице, то численное значение минимальной оценки (игнорируется инактивация или адаптация) представляет собой $\Delta G_0 7 k_B T$. Это число соответствует равновесным популяциям открытых и закрытых состояний. Таким образом, чтобы оценить свободную энергию в процессах воротного механизма, не требуется детальной зависимости дозы от ответа. Это важно, потому что, как показано далее, наблюдаемый наклон кривой P_o может значительно измениться в зависимости от того, какая часть механического стресса переносится параллельными эластическими элементами. В этом случае можно ошибочно предполагать, что канал с низким наклоном не чувствителен к механическому стрессу. Минимальный динамический уро*вень (DR) канала* $P_o(T_1)/ P_o(T_2)$ *обеспечивает минимальную оценку* ΔG без информации о влиянии эластических элементов.

При сравнении свойств МСК в биологических мембранах полезно рассматривать *DR*, учитывая обсужденное выше и иллюстрированное на рис. 11.2. Учитывая отсутствие данных о свойствах мембраны, отношение самой высокой вероятности к самой низкой могло бы быть лучшим стандартом, чем чувствительность наклона для сравнения свойств канала в различных системах.

Физические модели ворот МСК. Возвращаясь к проблеме физического моделирования МСК, мы можем задаться вопросом, что

есть физическое последствие выполнения, например $7k_BT$, работы на канале. Представьте цилиндрический канал диаметром 5 нм и приложенное натяжение, равное 1 пН/нм (1 дин/см). Если радиус канала увеличивается после открытия на Δr, то сделанная работа равна натяжению мембраны, умноженному на изменение площади, $T2\pi r\Delta r$. Таким образом, Δr равно 0,26 нм. Расширение диаметра канала от 5,00 до 5,52 нм вовлекает 7 k_BT энергии при создании натяжения величиной 1 дин/см.

Это наиболее малое изменение в относительных размерах при измерениях на молекулярных сенсорах. Для канала кохлеарных клеток линейное изменение в его размерах по некоторым оценкам было 2—4 нм. Вышеупомянутое вычисление было основано на условии, что воротные перемещения состояния канала вовлекали целую молекулу.

Существует много возможных моделей для объяснения того, как МСК активируются натяжением мембраны. Самой простой моделью является упомянутая выше, в которой канал рассматривается как диск, встроенный в гомогенную липидную мембрану, для которого открытые и закрытые состояния имеют различные площади (см. рис. 11.1). Такая модель соответствует работе встроенного MscL-канала, клонированного из *Escherichia coli* или канала, образованного при помощи антибиотика аламетицина в искусственном липидном бислое. Подобные модели могут быть сделаны для МСК в эукариотных клетках с силами, переданными на канал от элементов цитоскелета, находящихся параллельно мембране.

Кривая воротного механизма МСК представляет собой типичную сигмоидальную кривую, которая строится по отношению к давлению в пипетке как независимая переменная (см. рис. 11.2); как указано ранее, знание натяжения мембраны позволяет вычислить эффективный ΔA. К сожалению, T редко известно по двум причинам:

1) T не может быть рассчитано из trans-patch давления без знания радиуса искривления;

2) в клетках неизвестно соответствие различных элементов, которые проходят параллельно и не параллельно каналам.

Кроме того, ни радиус искривления, ни соответствие параллельных и непараллельных элементов не являются установленными параметрами. Оба, как ожидается, изменятся с приложенным давлением. Необходимо учитывать, что только часть приложенного натяжения достигает канала. В известной литературе широко представлены значения наклона кривых активации каналов в зависимости от натяжения мембраны. Более вероятно, однако, что эти кривые скорее характеризуют различные структуры цитоскелета, окружающие канал, и различия в геометрии patch, чем непосредственно различия в каналах.

Для канала в липидной мембране анализ сил более прост, чем для канала в реальной клеточной мембране, так как имеется только одна фаза, окружающая канал (хотя различные механические стрессы могут существовать в каждом монослое, как обсуждается ниже). Для бислоя в пипетке натяжение T может быть оценено на основании градиента давления P и знания радиуса искривления, используя уравнение Лапласа:

$$T = Pr/2,$$

где r — радиус искривления.

Известна одна опубликованная работа, в которой это было сделано впрямую при помощи метода patch-clamp. Ее существо заключалось в исследовании антибиотика аламетицина, который образует каналы с проводящими порами. В этом случае приложенное натяжение было в диапазоне 0—8 дин/см, и вероятность возникновения каждого уровня проводимости менялась согласно кривой с наклоном, приблизительно равным 8 дин/см/е-изгиба. Эта наклонная чувствительность соответствовала увеличению в площади приблизительно 1,2 нм^2.

В более сложной системе характеристика давления по отношению к натяжению была проведена в конфигурации whole-cell на сферобластах дрожжей различных размеров. Измеряли средние токи как функцию от давления. С учетом этих данных у везикулы 0,69 пФ, подвергнутой давлению в диапазоне 0—8 см рт. ст., наклон кривой зависимости давления по отношению к натяжению мембраны был приблизительно равен 0,05 дин/см/е-изгиба со средней точкой 0,7 дин/см. Это эквивалентно изменению площади канала (перехода канала из закрытого состояния в открытое) около 4,9 нм^2 и соответствует изменению в диаметре канала на 0,15 нм, если канал был диаметром 5 нм. Была измерена P_o по отношению к натяжению при patch-clamp клеток скелетной мышцы цыпленка и обнаружено, что кривая зависимости имела наклон приблизительно 3,3 дин/см/е-изгиба.

Бислой как два монослоя. При обсуждении моделей ворот канала рассматривался случай, когда мембранный липид является изотропным. Однако существуют работы, в которых мембрана рассматривается как два монослоя.

При изучении процессов активации МСК жирными кислотами было показано, что липидрастворимые амфипатичные соединения активируют МСК *Escherichia coli* посредством механизма, который, по-видимому, состоит в изменении кривизны бислоя. На основе модели, объясняющей взаимодействие эритроцита с химическими соединениями, было предположено, что амфипатичные вещества должны, по-видимому, входить во внутренний или наружный слои липидного бислоя. Это может изменить состояние одного моносля относительно другого и вызвать

микроскопические связи в бислое, которые передадут натяжение к механосенситивным рецепторам, или канальным белкам или цитоскелету. В этой модели гидрофобные катионы должны внедряться в относительно негативный заряженный внутренний слой, вызывая соответствующее связывание, как это показано в красных клетках. По-видимому, гидрофобные анионы должны внедряться в менее негативный наружный слой, изменяя его. Эта бислойная модель мембраны может быть важной в оценке передачи натяжения мембраны для изменения вероятности открытия канала.

Авторы апплицировали поверхностно-активные амфипатичные вещества с целью модификации липидной структуры бислоя и ворот МСК от *E. coli.* Эксперименты показали, что МСК активировались независимо от того, в какую сторону бислоя встраивали амфипатичные соединения. Когда эти вещества были встроены в обе стороны, деятельность МСК возвращалась к контрольному уровню. Подобные данные сообщались и для МСК в скелетной мышце цыпленка.

Эти эффекты были смоделированы при рассмотрении бислоя как двух монослоев, каждый из которых мог иметь различную величину натяжения с суммарным натяжением, равным T^{Σ}, созданной suction в пипетке. Введение амфипатичных молекул во внешний монослой заставило его расширяться. Если внешние и внутренние монослои ограничены в числе доступных липидов, то расширение внешнего слоя будет растягивать внутренний монослой и таким образом активировать канал. Аналогия для этого сопряженного эффекта заключается в растяжении пары эластичных лент (монослоев) и затем в осуществлении растяжения (амфипатичными соединениями) одной из них. Нагрузка была бы передана к более короткой ленте, увеличивая ее натяжение.

Когда оба монослоя содержали равные количества амфипатичных соединений, площадь мембраны увеличилась одинаково в обеих половинах без увеличения натяжения в любом монослое, и канал не был активирован (см. рис. 3.6).

Эта теория расширения бислоев основана на ряде допущений. Во-первых, мембрана не может переходить в естественное расслабленное состояние из-за наличия амфипатичных молекул в одном монослое. Во-вторых, площадь внутреннего и внешнего монослоев должны быть равны, т. е. число фосфолипидов во внешнем и внутреннем монослоях не изменяется при встраивании амфипатичных соединений или приложении натяжения. В-третьих, МСК активируются приложением натяжения к любому монослою.

Изучаемый канал требовал существенного T^{Σ} для активации даже в присутствии амфипатичных соединений (T_0 была большая). Это подразумевало, что оба монослоя были под T^{Σ} независимо от присутствия амфипатичных молекул. Подобные эксперименты

должны быть сделаны на другом МСК с более низкими значениями T_0.

Если бы было обнаруженно, что МСК отвечают на амфипатичные соединения без T^{Σ}, теория должна быть переоценена, поскольку в этом случае канал будет находиться под сжатием в монослое, содержащем амфипатичные молекулы, и под натяжением в монослое без амфипатичных молекул. Если бы подобные результаты были получены, это свидетельствовало бы о том, что канал отвечал только на натяжение, но не на сжатие.

Были отмечены некоторые конфликты между экспериментами и теорией. Например, нейтральные амфипатичные соединения вызывали подобные эффекты, хотя можно было доказать, что из-за различий свойств во внутреннем и внешнем монослоях нейтральные амфипатичные молекулы распределялись асимметрично. Кроме того, было обнаружено, что чувствительность к амфипатичным соединениям зависела от окружающей липидной среды.

Устранение встречающегося в естественных условиях липопротеина уменьшило природную чувствительность канала и ее способность ответить на встраивание небольших амфипатичных молекул типа хлоропромазина (chloropromazine) и тринитрофенола (trinitrophenol). Сообщалось, что время возникновения эффекта этих веществ было труднообъяснимым. Активация канала при помощи встраивания амфипатичных соединений была медленной ($t_{1/2}$ = 20 мин). Авторы полагали, что длительное время наступления эффекта связано с тем, что амфипатичные молекулы со стороны введения должны были подвергнуться медленному распространению к противоположной стороне.

Альтернативным объяснением этих данных является то, что амфипатичные соединения изменили местное мембранное искривление и открытие МСК было чувствительно к местному искривлению мембраны. Известно, что разные составы амфипатичных соединений могут изменять характерное искривление липидного бислоя и красных клеток, хотя симметрия активации МСК амфипатичными молекулами на различных сторонах мембраны все еще была бы трудно объяснима. Механосенситивный канал должен был бы активироваться искривлением любого знака.

Независимо от теории эти наблюдения весьма интересны. Теория, казалось бы, включала основные элементы, требуемые для объяснения данных, несмотря на некоторые несовпадения. Эксперименты должны быть повторены на других системах. В этом случае должны быть сделаны измерения, позволяющие проверить предположения относительно возможности изменения посредством амфипатичных соединений местного мембранного искривления. Было бы особенно интересно знать, подтвердятся ли эти наблюдения для MscL-канала, который теперь был клонирован от *E. coli*,

потому что это открыло бы возможность молекулярного анализа явления. Полезным амфипатичным веществом может быть *хлортетрациклин*. В красных клетках препарат может обратимо разделять внешний или внутренний слои мембраны под контролем внеклеточного уровня Ca^{2+}.

Количественная характеристика бислоя как двух динамических монослоев была недавно продемонстрирована и может иметь от-

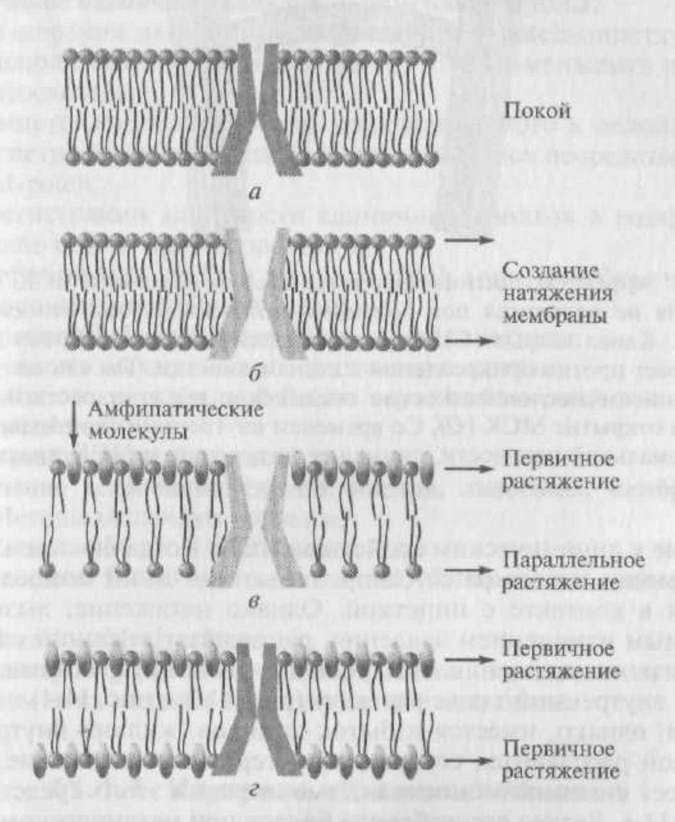


Рис. 11.3. Механосенситивные каналы в бислоях под влиянием созданного в них натяжения и при введении амфипатичных соединений:

а — мембрана и канал в покое; *б* — мембрана находится под натяжением (вызванным давлением), которое тянет молекулы липида обособленно, что приводит к открытию канала; *в* — амфипатичные молекулы, добавленные в верхний монослой. Это приводит первично к эффекту расширения верхнего монослоя. Однако поскольку число молекул липида в каждом слое принято постоянным, расширение верхнего монослоя растягивает нижний монослой, подвергая его увеличенному натяжению. Верхний монослой не напряжен, потому что амфипатичные молекулы осуществляют лишь разделение липидов. Натяжение между молекулами липида в нижнем монослое растягивает канал, активируя ворота; *г* — если амфипатичные молекулы встроены в оба монослоя, то увеличения натяжения нет и каналы остаются закрытыми

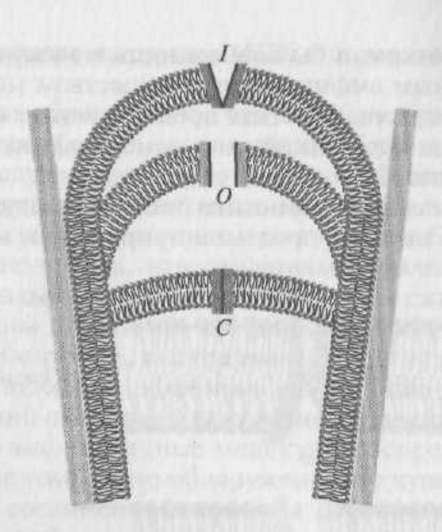


Рис. 11.4. Эффект скольжения монослоя в бислоях и свойства МСК. В покое мембрана не находится под большим натяжением, она относительно плотная. Канал закрыт (*C*). Ступенька suction тянет мембрану вверх и растягивает против прикрепления к стенам пипетки. Так как внешние и внутренние монослои вязкостно соединены, оба они растягиваются, вызывая открытие МСК (*O*). Со временем внутренний слой возвращается к нормальной плотности, снимая ее натяжение, и МСК инактивируется (*I*)

ношение к динамическим свойствам МСК. Когда бислои изучают при помощи метода patch-clamp, только внешний монослой находится в контакте с пипеткой. Однако натяжение, вызванное внезапным изменением давления, растягивает внешний слой, но из-за вязкого сцепления между внешними и внутренними монослоями внутренний также растянут (рис. 11.3 и рис. 11.4).

Если, однако, имеется избыток липидов, жидкий внутренний монослой расслабится со временем, теряя все натяжение, которое имеет внешний монослой. Демонстрация этого представлена на рис. 11.4. Вязкое расслабление бислоя при механическом стрессе может считаться «адаптацией» или инактивацией, замеченной у MscL-канала в липидном бислое. Время, требуемое для расслабления избыточной плотности, будет порядка

$$\tau = (2r_v^2 \ln (2r_v/r_p))/D,$$

где r_v — диаметр везикулы, прикрепленной к пипетке (резервуар избытка липидов); r_p — радиус пипетки; D — эквивалентная диффузионная константа, которая имеет значения 10^{-5} см^2/с.

Для r_v = 10 ммоль/л и r_p = 1 ммоль/л τ = 0,6 с не сильно отличается от значений, наблюдаемых для MscL.

11.1.3. Методы механической стимуляции

Учитывая эмпирическое определение того, что представляют собой МСК, важно понять формы механической стимуляции и некоторые из ограничений, присущих применению механической стимуляции. Для изучения отдельных каналов и целых клеток был разработан ряд методов.

Изучение единичных каналов. Применяют методы:

1) измерения давления, приложенного в patch-пипетку;

2) использования «нежного» patch, чтобы уменьшить изменения цитоскелета;

3) гипотонического стресса, прикладываемого к целой клетке при регистрации активности единичных каналов посредством cell-attached-patch;

4) регистрации активности единичных каналов в конфигурации whole-cell от маленьких клеток;

5) inflation или swelling на фоне patch (они подобны чрезвычайно большим outside-out patch).

Изучение whole-cell токов. Применяются методы:

1) прямого механического растяжения клеток;

2) inflation клетки или deflation через broken-patch в конфигурации whole-cell;

3) анизотропного стресса.

Изучение встроенных систем: бислоя, липосомы, мембранных blebs. Методы включают изучение:

1) *E. coli* — MscL в липосомах;

2) бычьего ENaC (эпителиальный Na^+-канал) в плоских бислоях;

3) *E. coli* — MscL в blebs.

Рассмотрим результаты экспериментов, выполненных с применением этих методов механической стимуляции.

11.1.4. Изучение единичных каналов

Стимулирование давлением. Присасывание patch-пипетки к мембране в результате создания в ней отрицательного давления носит название suction (pipette suction), однако в определенном контексте термин может носить несколько иной оттенок, например когда рассматривается влияние suction на ионный канал мембраны. В этом случае речь идет о дискретном создании отрицательного давления, измеряемого в миллиметрах ртутного столба, в patch-пипетке с целью изучения влияния деформации мембраны под действием этого давления на ионный канал.

Поведение единичного канала, выявляемое suction, легко идентифицировать как МСК, потому что его физиологический ответ

наступает весьма быстро. При этом ключевая переменная — натяжение мембраны, а не давление в пипетке. В то же время натяжение мембраны редко измеряется. Обычно измеряют давление в пипетке, хотя оно в каждом случае создает разное давление как на мембрану, так и на цитоскелет, и эти величины неизвестны. Сообщаемое авторами давление в пипетке является обычно ошибочным, так как оно гасится из-за остаточного капиллярного давления, высоты колонки жидкости или погрешности источника давления. Лучший способ устанавливать давление на нуле заключается в такой регулировке источника давления, чтобы прекратился поток жидкости через кончик пипетки, что визуализируется движением маленьких частиц в перфузионной камере.

Натяжение по сравнению с давлением. Второй фактор, воздействующий на величину стимула, — это то, что натяжение мембраны является функцией давления в пипетке и радиуса искривления мембраны.

Ранние исследования МСК часто содержали представления относительно эквивалентности гидростатического давления и натяжения мембраны. У тонкостенных сфер гидростатическое давление (P) и натяжение стенки (T) связаны законом Лапласа

$$T = \frac{Pd_c}{4}, \qquad (11.2)$$

где d_c — диаметр сферы.

Изучение давления по сравнению с натяжением было проведено в конфигурации whole-cell на сферобластах дрожжей различных размеров. В то время как кривая механосенситивного тока по отношению к приложенному давлению показывает четкую зависимость от диаметра сферобласта, кривые тока по отношению к натяжению (рассчитано по закону Лапласа) были не зависимы от диаметра. Эти исследования демонстрируют, что натяжение мембраны представляет собой важный параметр для контроля активности SAC.

Связь натяжения мембраны как функции давления при patch и радиуса искривления анализируется сложно. В настоящее время не имеется никакого способа знать искривление мембраны без непосредственной визуализации и измерения геометрии стимулируемого фрагмента мембраны. Радиус кончика пипетки — не лучший индикатор радиуса искривления по двум причинам: при patch мембрана запечатывает не только кончик пипетки, но и относительно глубоко входит в пипетку, и радиус искривления — функция давления транс-patch. Последний эффект был проанализирован на базе предположения, что мембрана является двумя упругими листками. В результате натяжение мембраны представлено в неявном виде:

$$P = (4K_A/r)(T/K_A)^{2/3}/(1 + T/K_A),$$

где P — давление; K_A — эластичность области; T — натяжение; r — радиус пипетки.

Как это показано, натяжение — функция радиуса зоны patch. Приложенное давление 10 мм рт. ст. может продуцировать натяжение порядка 3,9; 2,9; 1,8 или 1,2 дин/см в зависимости от радиуса зоны patch (3; 2; 1; 0,5 мкм, K_A = 50 дин/см). Так как outside-out patch вообще имеют меньший радиус, МСК в таких patch имеют тенденцию быть менее чувствительными к давлению. Patch больших размеров должны показывать МСК с более высокой чувствительностью к давлению. Это имеет важные последствия для оценки деятельности SAC. При формировании больших patch чувствительность SAC может казаться увеличившейся, когда как фактически она неизменна или даже уменьшена. В этом случае эластичность области, вероятно, также меняется, делая результат еще более сомнительным.

В модели эластичных листков patch, описанной выше, натяжение нелинейно зависит от давления. В этой модели пренебрегают натяжением покоя, хотя его можно включать в расчеты. Существование натяжения покоя можно показывать, наблюдая шапочку (скорее, чем морщинистый) профиль patch при нулевом давлении и экстраполяцией участка dA/dT к нулевому значению натяжения. Натяжение покоя может быть вызвано прилипанием мембраны к стене пипетки (по оценкам в пределах 0,5—4,0 дин/см для липидов) или перпендикулярным к мембране натяжением, являющимся результатом искажения, вносимого цитоскелетом. Изучение механики зоны patch демонстрирует дополнительную сложность: бислой течет при натяжении так, что его количество в пределах зоны patch непостоянно.

Идеальная сферическая клетка. Если МСК играют роль в регуляции объема клетки, тогда резонно спросить, будут ли физиологические изменения в объеме клетки продуцировать достаточное натяжение мембраны, чтобы активировать МСК. Хотя многие типы клеток меняют натяжение мембраны в течение swelling, возможно приложить закон Лапласа (см. уравнение (11.3)) и считать, что мембрана представляет собой идеальную эластическую систему. В этом случае дополнительное натяжение мембраны при cell-attached patch (ΔT_p), которое ассоциируется с относительным увеличением поверхностной зоны patch $\Delta A/A$, может быть описано на основании применения закона Гука:

$$\Delta T = K_A(\Delta A/A), \quad (11.3)$$

где K_A — значение эластического коэффициента.

Этот параметр может быть установлен при определенном допущении величины гидростатического давления. Подобным обра-

зом клетки, которые увеличивают свою поверхность при swelling, могут увеличивать натяжение мембраны, как описано в уравнении.

Эластический коэффициент K_A определяется имперически, и клеточная $\Delta A/A$ связана относительными изменениями в клеточном объеме $\Delta V/V$ посредством поверхность/объем зависимости для идеальной сферы:

$$\left(\frac{\Delta A}{A}\right)_c = \left(1+\frac{\Delta V}{V}\right)^{2/3} - 1. \qquad (11.4)$$

Комбинация уравнений (11.3) и (11.4) позволяет получить прирост в натяжении мембраны клетки, ассоциирующийся с относительным увеличением в объеме клетки $\Delta V/V$, а это:

$$\Delta T_c = K_A\left[\left(1+\frac{\Delta V}{V}\right)^{2/3} - 1\right]. \qquad (11.5)$$

Можно использовать это уравнение, чтобы установить увеличение в клеточном объеме, необходимое для возникновения достаточного натяжения мембраны, чтобы активировать SAC. Если клетка гипотонически раздута примерно на 1 % (т.е. $\Delta V/V = 0{,}01$), то относительный объемный фактор становится:

$$\left[\left(1+\frac{\Delta V}{V}\right)^{2/3} - 1\right] = \left(0{,}01^{2/3}\right) - 1 = 0{,}007.$$

Представим эластический коэффициент K_A для целой клетки порядка 12 дин/см. Увеличение натяжения мембраны T_c (дин/см) произойдет в клетке при увеличении объема клетки на 1 %:

$$T_c = 12 \cdot 0{,}007 = 0{,}009.$$

В свою очередь из этого вытекает, что такое натяжение достаточно для активации некоторых классов МСК. Например, натяжение, развившееся при patch на мембране 0,5 мкм в диаметре, которое ведет к негативному давлению 6 см вод. ст., приведено в следующем уравнении:

$$T = \frac{Pd}{4} = \frac{6 \cdot 980\ \text{дин/см}^{-2} \cdot 0{,}5 \cdot 10^{-4}}{4} = 0{,}007\ \text{дин/см}. \qquad (11.6)$$

Но предварительные исследования показали, что эта величина suction активирует SAC_K амфибий.

Таким образом, натяжение мембраны клетки (T_c) 0,009 дин/см возникает при увеличении объема клетки на 1 % и может быть достаточным для активации МСК в этом препарате. Если это так,

то почему обычно считается необходимым раздуть клетку на 50 %, чтобы определить значительное увеличение P_o? Этот парадокс возник из явного несоответствия между диаметром cell-attached-patch под пипеткой и диаметром клетки. Если бы было возможно образовать giga seal на половине клетки, то увеличение в клеточном объеме на 1 % будет продуцировать достаточное натяжение на этом супер-patch, чтобы активировать МСК.

На практике пипеточный кончик более чем 1 мкм (giant-patch представляет собой вариант метода patch-clamp, когда используют большие диаметры кончика пипетки, имеющие низкие сопротивления) не способен к образованию стабильного giga seal в большинстве клеток. Giant-patch, который образуется на сердечном миоците, — важное исключение. Не ясно, может ли giant-patch-техника использоваться на эпителиальных клетках, однако это надо рассмотреть, потому что это будет увеличивать отношение зоны patch к клеточному диаметру (d_p/d_c). Когда единичный канальный ток зарегистрирован из зоны patch с небольшой сферой по сравнению с клеточной поверхностью, механическое сжатие на tight seal уменьшает натяжение в cell-attached-patch (T_p) в пропорции, связанной отношением (d_p/d_c), которое может быть мало́ (0,5/30 = 0,017 мкм). Эта ситуация выражается уравнением, которое вытекает из закона Лапласа:

$$P = \frac{T_c}{d_c} = \frac{T_p}{d_p}. \qquad (11.7)$$

Необходимое условие, что обе области — неклампированная область мембраны клетки и область всосавшейся мембраны — должны иметь то же самое гидростатическое давление (P), которое описывает c указанной клетки и p указанного patch.

Комбинируя уравнения (11.5) и (11.7) можно рассчитать увеличение натяжения, которому подвергается cell-attached-patch при 60 % увеличении клеточного объема ($\Delta V/V$):

$$\Delta T_p = \frac{d_p}{d_c} K_A \left[\left(1 + \frac{\Delta V}{V}\right)^{2/3} - 1\right] = \frac{0,5}{30} \cdot 12 \text{ дин/см}\left[(1 + 0,6)^{2/3} - 1\right] =$$

$$= 0,08 \text{ дин/см}.$$

Другими словами, требуется увеличение объема клетки на 60 %, чтобы вызвать достаточное натяжение (более 0,07 дин/см) в cell-attached-patch и подвергнуть МСК такому же воздействию, как прямая аппликация suction величиной 6 см вод. ст. (см. уравнение 11.6).

Механика неидеальной мембраны. Хотя приведенные расчеты и помогают, но значительным допущением является то, что форма

мембраны на кончике patch-пипетке есть идеальная полусфера. Сферическая область при patch часто возникает очень далеко от кончика пипетки, так что зона patch представляет собой омегообразную форму с длинной прямой частью мембраны, находящейся в тесном и прямом контакте со стеклянной стенкой пипетки. Преимущественно эта прямая часть мембраны и есть сторона giga seal. Наблюдения в световой микроскоп, так же как и в электронный микроскоп, выявили цитоплазматический и цитоскелетный материал внутри patch-пипетки.

В одних случаях suction полностью нарушает форму мембраны, в то время как в других случаях просто уменьшает радиус кривизны порции мембраны, которая попала внутрь пипетки, в то время как прямая часть мембраны, прилегающая к стеклу, остается неизмененной. Таким образом, некоторые из основных концепций идеальных полусферических patch, рассмотренные в предыдущем подразделе, могут быть применены к сферической части мембраны, охватываемой пипеткой. Однако присутствие вискозной цитоплазмы внутри пипетки и различное установление K_A-результирующей из омегообразной формы patch могут изменять некоторые из упомянутых представлений о том, как клеточный swelling действует на натяжение мембраны.

Высокоразрешающая микроскопия показывает, что suction пропорционально увеличивает зону и емкость patch, так что специфическая емкость остается относительно неизмененной. Таким образом, сфера зоны patch увеличивается при почти постоянной мембранной толщине. Соответственно увеличение в поверхности зоны patch в течение растяжения не обусловлено мембранным утончением, но, по-видимому, зависит от притока липидов, поступающих от стенки patch-пипетки. Устранение suction вызывает сжатие зоны присасывания под patch, которое, возможно, обусловлено эластическими восстанавливающими силами подлежащего и связанного с мембраной цитоскелета.

Несмотря на движение липидов вдоль стенки, мембрана сама остается ригидно прилипшей к стеклу в обоих типах patch: excides и cell-attached. Это означает, что соединение «мембрана—стекло» включает специфические протеины, которые связываются со стеклом, в то время как поверхностные гликопротеины обеспечивают высокорезистивный мостик между наружным листком мембраны и стеклянной пипеткой. В такой модели suction может продуцировать реальное увеличение в зоне patch через липидный ток без пуллинга новых канальных протеинов внутрь зоны patch.

Разделение натяжения. При определении стимула наиболее трудно решаемая проблема заключается в том, что мембрана представляет собой сложную структуру, состоящую из липидного бислоя, трансмембранных белков, внеклеточного матрикса и параллельных и непараллельных мембранных структур, связанных с

цитоскелетом и присоединенных к внутреннему кортикальному цитоскелету. Та часть аппликированного механического стресса, которая достигает канала, может иметь зависимость от времени и скорости приложенного воздействия. Последствие этого недостатка при контролируемой механической стимуляции заключается в том, что любое вмешательство, которое затрагивает деятельность канала, может быть связано с модуляцией цитоскелета или внеклеточного матрикса. Любое вмешательство, воздействующее на путь, по которому сила достигает канала, или воздействующее на размер зоны patch и его искривление, может затрагивать и чувствительность канала.

Адаптация. Несколько типов МСК демонстрируют времязависимое уменьшение P_o в условиях постоянного или повторного пипеточного suction. Эту адаптацию некоторых типов МСК можно отличить от инактивации, потому что канал остается сенситивным к механическим стимулам, хотя и с уменьшенной чувствительностью к растяжению. Адаптация сообщалась для МСК ооцитов ксенопуса, дрожжей и высших растений. Она не зависит от Ca^{2+}, и это подтверждается двумя типами экспериментов: на единичных каналах и на уровне whole-cell. Адаптация регистрируется при негативных клеточных мембранных потенциалах и практически исчезает, когда потенциал фиксирован в позитивной области. Поскольку адаптация, но не механочувствительность, легко устраняется после сильного suction, механизм адаптации может вовлекать взаимодействие цитоскелета и мембраны, которое может быть нарушено механическим стрессом.

Растяжение целой клетки. К сожалению, невозможно качественно зарегистрировать активность единичных каналов в режиме cell-attached, вызванную растяжением целой клетки. При запечатывании мембраной стеклянной пипетки невозможно для зоны patch и сопряженного с ней мембранного кортекса физически растянуться вместе с остальной частью клетки при сохранении cell-attached. Таким образом, пока нет возможности прямо прикладывать натяжение к клеткам (типа растягивания за их концы) при одновременной регистрации деятельности МСК в режиме cell-attached patch. Однако иногда возможно наблюдать деятельность единичных каналов (с низким разрешением) при регистрации токов от маленьких целых клеток или везикул.

11.1.5. Липидрастворимые соединения и возможность открытия SAC

Процессы механической активации могут имитировать нормально существующую физиологическую регуляцию. Например, эндогенные жирные кислоты увеличивают возможность открытия МСК

подобно растяжению мембраны и посредством процессов, которые не зависят от путей арахидоновой кислоты. Активация МСК свободными жирными кислотами наблюдалась у Ca^{2+}-зависимых K^+-каналов с высокой проводимостью у клеток гладкой мышцы пульмональной артерии и в K^+-каналах с низкой проводимостью у мышечных клеток желудка жаб.

Одна гипотеза, объясняющая участие жирных кислот в передаче механического сигнала, заключается в том, что физическая деформация при patch активирует связанные с мембраной фосфолипазы, обеспечивая, таким образом, освобождение жирных кислот из бислоя, которые затем прямо воздействуют на канальные белки. Механизм может включать связывание жирных кислот с каналом через процессы, подобные активации жирных кислот протеинкиназой С. Эквивалентно возможно, что эндогенные жирные кислоты, освобожденные при растяжении клетки или при ее swelling, непрямо влияют на P_o путем изменения или мембранного жидкостного состояния, или липидного окружения каналов.

11.1.6. Изучение токов в конфигурации whole-cell

Прямое механическое растяжение клеток. Наиболее простой формой механической стимуляции должно быть растяжение целой клетки, что крайне сложно. Скелетные мышцы являются одним из препаратов, где возможно прямое растяжение клеток. Несмотря на то что наблюдалось вызванное растяжением увеличение во внутриклеточном Ca^{2+}, оно не зависело от внеклеточного Ca^{2+}. Это предполагало, что каналы мембраны клетки не участвуют в процессах растяжения (МСК во внутриклеточных органеллах еще не были обнаружены).

Гладкомышечные клетки кровеносных сосудов и мочевого пузыря растягивались по следующей схеме: сначала один конец, а затем и второй конец клетки вводили в микрокапилляры, установленные на микроманипуляторах. Регистрирующую patch-пипетку подводили к центру клетки. При помощи микроманипуляторов увеличивали расстояние между капиллярами и, следовательно, осуществляли растяжение клетки. Был применен и другой подход. Клетку раскладывали на два параллельно идущих стеклянных капилляра, к которым она своими концами прилипала. Эта пара капилляров заранее была подсоединена к микроманипуляторам. Затем к центру клетки подводили patch-пипетку и осуществляли patch-clamp в конфигурации whole-cell. Далее увеличивали расстояние между капиллярами и, следовательно, растягивали клетку. В этих случаях были зарегистрированы вызванные растяжением входящие токи.

Наибольшие проблемы возникли с кардиомиоцитами. Кардиофизиологи потратили много времени, исследуя методы, при помощи которых можно прикрепить растягивающие системы к клетке, чтобы измерить зависимость механосенситивных ионных токов от длины клетки. Ранее использовали карбоновые нити или стеклянные капилляры, которые хорошо прикрепляются к мембране. Работа с карбоновыми нитями продемонстрировала, что натяжение мембраны при растяжении клетки достаточно однородно. Однако интервалы между саркомерами не изменяются. Возможно, это означает, что имеется существенная жесткость сжимающего аппарата поперек диаметра волокна. До последнего времени не удавалось растянуть кардиомиоцит и одновременно регистрировать токи в условиях whole-cell. Эти работы появились только в 2000 г. и обсуждаются далее.

Было представлено несколько сообщений о растяжении целой клетки при условиях фиксации потенциала. В этих сообщениях обсуждался вызванный растяжением катионный ток, который реверсировался при –15 мВ.

При другом методическом подходе механочувствительные токи в конфигурации whole-cell были вызваны нажатием на сферическую клетку одной пипеткой, в то время как фиксация потенциала проводилась другой.

Хотя фиксация потенциала более предпочтительна для получения количественных характеристик клеток, эксперименты с фиксацией тока и использованием индикаторов Ca^{2+} показали вызванную растяжением деполяризацию и увеличение внутриклеточного Ca^{2+} в клетках сердца морской свинки. Подобные результаты были получены в клетках сердца цыпленка, в эндотелии, глии, остеобластах, узловом ганглии и эпителиальных клетках. Например, у сердечных клеток механическая деформация вызвала осцилляции Ca^{2+}. Эти эффекты зависели от внеклеточного Ca^{2+} и блокировались Gd^{3+}. Предполагается, что МСК обеспечивают вход Ca^{2+} до определенной концентрации, при которой относительно небольшой поток Ca^{2+} через МСК способен вызвать освобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума.

В различных вариантах экспериментов с измерением внутриклеточного Ca^{2+} эндотелиальные клетки и клетки легкого были подвергнуты механическому стрессу, вызванному потоком жидкости или культивированием клеток на сокращающихся подложках, выполняющих радиальное или линейное растяжение. У клеток легкого увеличение внутриклеточного Ca^{2+} не было вызвано работой МСК, потому что ответ клеток был нечувствительным к внеклеточной концентрации Ca^{2+}. Напротив, растяжение фибробластов пипеткой было способно вызвать эндосомный релиз, который зависел от внешнего Ca^{2+}.

Это разнообразие путей, по которым механическое растяжение может вызывать физиологические ответы клеток, указывало на необходимость выполнить прямые эксперименты с использованием метода patch-clamp в конфигурации whole-cell, чтобы проверить роль МСК в этих ответах клеток.

Гидростатическое раздувание клетки (inflation). Гидростатическое давление иногда используют как механический стимул в конфигурации whole-cell для inflation клетки через patch-пипетку. Вызывать механический стресс клетки подобным способом, безусловно, можно, но распределение стресса нелинейное. Это демонстрируется в модельном эксперименте с инъецированием воды в шарик желатина.

При этой методике возможный артефакт возникает из-за потока раствора через кончик пипетки. Этот поток может влиять на потенциал кончика пипетки посредством электрохимических (в данном случае электроосмотических) эффектов. Сообщалось, что кончик пипетки часто механически блокируется.

Осмотическое раздувание клетки (Swelling). *Поскольку гипотонический* swelling является весьма нежным способом деформации *клеток, он был выбран многими исследователями.* К сожалению, swelling может быть причиной воздействия на различные системы клетки. Он ведет к объемному стрессу цитоскелета, стрессу органелл, увеличению площади плазматической мембраны и прямой активации некоторых каналов, включая МСК. В целом наиболее общий эффект при swelling заключается в активации Cl^--проводимости. Трудность интерпретации данных с использованием swelling показана применительно к ооцитам ксенопуса. У них есть катионные МСК, но swelling активирует анионные токи и нет никакого свидетельства активации посредством swelling токов через МСК. В клетках сердца цыпленка вызванные натяжением мембраны токи в конфигурации whole-cell были катионными, однако токи, вызванные swelling, оказались анионными. Возможно, целесообразно ввести термин «swelling-индуцированные токи».

11.1.7. Молекулярно-биологический подход к изучению МСК

В настоящее время имеется очень мало информации о структуре МСК. Их клонирование, как, впрочем, и клонирование других *каналов, начато относительно недавно. Были клонированы несколько различных каналов, которые демонстрируют механочувствительность:* это MscL-канал бактерий, НМДА-канал, активируемый глутаматом катионнеселективный канал, Ca^{2+}-активируемый K^+-канал гладкомышечных клеток, регулируемый G-белком K^+-канал аномального выпрямления — GIRK.

Из них только один МСК был клонирован из *Escherichia coli* и обозначен как MscL. Маленькая пептидная единица (15 кДа), кодированная геном, формирует полимеры из 136 аминокислот с центральной областью в виде гидрофобной поры. Предполагаемая структура — гексамер — отличается от полимера с пятью единицами, которые составляют НМДА-канал, тетрамера Ca^{2+}-активируемого K^+-канала и четырех единиц у GIRK. MscL-канал обладает проводимостью в 3 нСм (измерено при 200 ммоль/л KCl) и является одним из пяти типов МСК, представленных в *E. coli*.

Некоторые из генов, кодирующие компоненты механочувствительной системы у нематод *Caenorhabitis elegans*, были полностью или частично клонированы. Более 12 генов (обозначены как *mec*-), как обнаружено, специально требуются для развития и функционирования осязательных рецепторных нейронов. Продукты *mec-4*, *mec-10* и *mec-6* могут формировать канальный комплекс, в то время как несколько других *mec*-генов могут быть важны для регуляции каналов. В мышечных клетках *Caenorhabitis elegans* МСК (UNC-105), как обнаружилось, специфически взаимодействуют с IV типом коллагена (LET-2) во внеклеточном матриксе, что означает модель, в которой силы передаются каналу через коллагеновую сеть и, возможно, вызывают вызванные растяжением сокращения. Эти данные позволяют предположить, что внеклеточный матрикс должен быть добавлен к модели внутриклеточного цитоскелета как потенциальный путь передачи силы для активации МСК у эукариотов.

Встраивание в липидные мембраны МСК является хорошим способом проверки работы этих изолированных ионных каналов. Это хорошо получилось для MscL-канала. Как обсуждалось, бислой может быть объектом адаптации из-за распределения там нагрузки. Кроме того, не имеется никаких данных о том, что бислой находится под натяжением в эукариотных клетках. Изучение механики кортекса мембраны нейронов свидетельствует, что плоскостное натяжение бислоя нейронов слишком слабо, чтобы вызвать принципиальный эффект открытия МСК. Таким образом, если встроить МСК в бислой (плоский или везикулярный) и показать активацию канала растяжением, то наиболее вероятным заключением было бы существование артефакта: канал не чувствует натяжения липидов in vivo. Это достаточно серьезная проблема при оценке клонированного МСК. Одинаково серьезные проблемы существуют при использовании плоского липидного бислоя вместо липидных визикул. Плоские липидные бислои находятся под существенным релаксационным натяжением в диапазоне 1—5 дин/см в зависимости от состава. Таким образом, МСК в плоском бислое имел бы тенденцию быть активированным в «покое».

11.1.8. Роль цитоскелета в регуляции воротного механизма МСК

Физиологический ответ клетки на прямое механическое воздействие возникает как следствие взаимосвязанного функционирования ее структурных элементов и вторичных мессенджеров. Белки клеточной поверхности и экстрацеллюлярный матрикс, связанные посредством трансмембранных белков с цитоскелетом, при механической деформации клетки приводят к активации ионных каналов (рис. 11.5). Преобразование механического сигнала на уровне клетки может выражаться как в ее электрофизиологических, так и биохимических ответах. Изменение концентрации лигандов на поверхности клетки также может быть непрямым механизмом преобразования механического сигнала.

До настоящего времени однозначно не решен вопрос о том, благодаря чему «включается» МСК, т.е. какая структура клетки осуществляет передачу механического сигнала на канал, заставляя его активироваться или инактивироваться. Недавние микромеханические эксперименты подтверждают представления о том, что МСК могут быть связаны с цитоскелетом.

Большинство авторов рассматривают в качестве преобразующей системы F-актин микрофиламентов (рис. 11.6), поскольку показано, что стимуляция аденилатциклазы и механосенситивный ответ клетки на деформацию ингибируются специфическим агентом, деполимеризующим актин микрофиламентов. Микрофиламентная сетка поддерживает натяжение в клетке, которое совме-

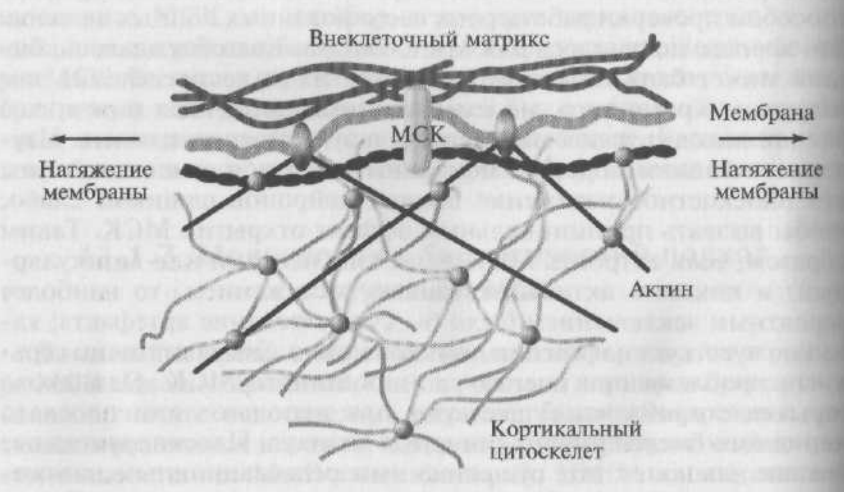


Рис. 11.5. Структуры, способные влиять на функционирование МСК. Механические силы могут передаваться к каналам через экстрацеллюлярный матрикс и различные компоненты цитоскелета

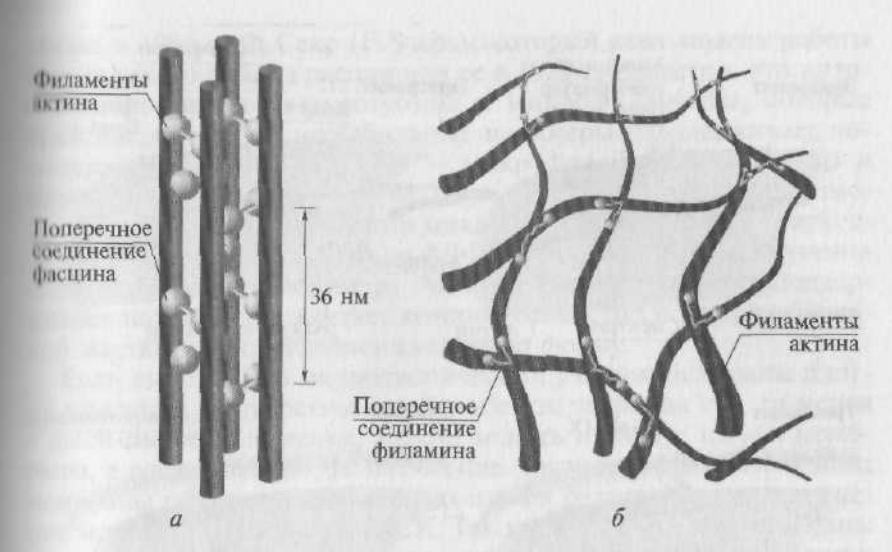


Рис. 11.6. Короткие и жесткие поперечные соединения связывают пары длинных и изгибаемых актиновых филаментов:

а — длинные и гибкие актиновые филаменты формируют пучки посредством поперечных соединений с короткими и жесткими протеинами; *б* — длинные поперечно-связанные протеины сгибаемы, поэтому поперечно-связанные пары филаментов могут лежать под различными углами. Филамин может иметь угол до 90° и таким образом поперечно связывать ортогонально ориентированные филаменты

стно с микротубулярной жесткостью определяет клеточную форму.

Транспортные системы могут быть заякорены к цитоскелету мембраны для фиксации в определенном месте клетки или, наоборот, служить местом фиксации как якоря цитоскелета (рис. 11.7) или непосредственно, или через анкирин. Так, в эритроцитах анионный обменник Band 3 заякорен спектрином к мембране для механического укрепления клетки. Сцепление с цитоскелетом транспортных систем, которые поставляют метаболиты, например в скелетной мышце, характерно для многих заякоренных мембранных ферментов, активность которых находится под влиянием натяжения мембраны.

Близость основанного на F-актине цитоскелета к Na^+-каналам в А6-клетках предполагает, что цитоскелетная сеть может использоваться для регуляции некоторых типов каналов. Это предположение было подтверждено экспериментами, демонстрирующими, что соединения, увеличивающие относительное количество коротких актиновых филаментов (цитохалазин D, экзогенный актин с АТФ или гельзолин), увеличивают и возможность открытия Na^+-каналов у А6-клеток. Некоторые потенциалуправляемые

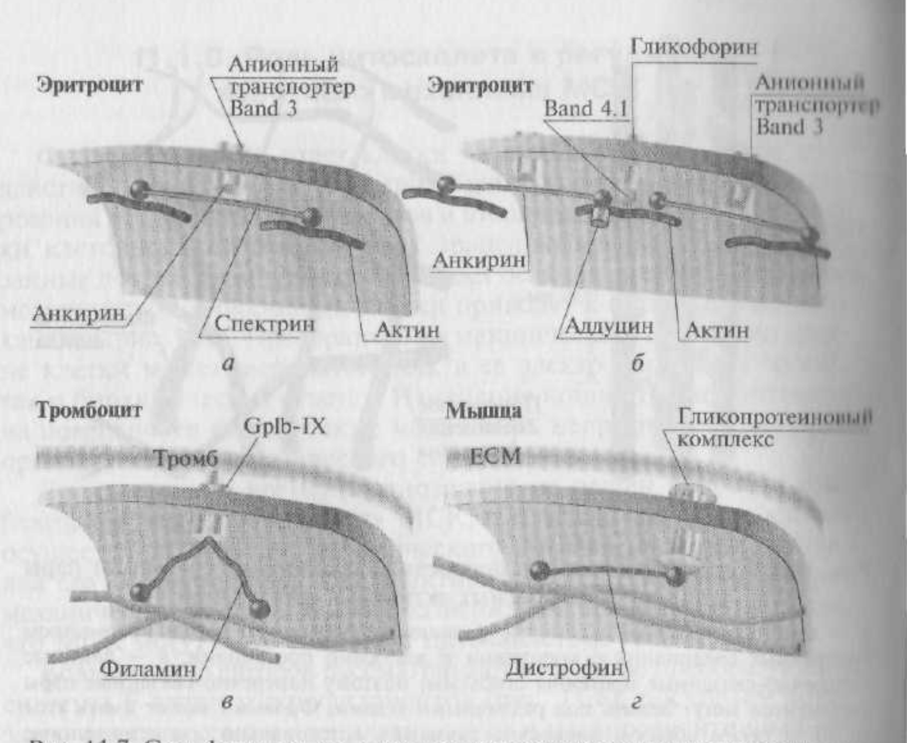


Рис. 11.7. Сеть филаментов, которые поддерживают внутреннюю поверхность плазматической мембраны. Сеть прилегает к интегральным белкам мембраны не прямо, а посредством различных периферических белков: *а* — в мембране эритроцита спектрин и анкирин связывают короткие актиновые филаменты с интегральным белком мембраны — активным переносчиком Band 3. При этом Band 3 связан с анкирином; *б* — второй вариант соединения образован Band 4.1, который связывает актин с другим интегральным белком мембраны — гликофорином; *в* — в мембране тромбоцитов трехмерная сеть актиновых филаментов прикреплена к интегральному мембранному гликопротеиновому комплексу Gplb-IX посредством филамина. Этот комплекс связывает протеины в кровяном сгустке снаружи тромбоцита. Кроме того, существует двумерная сеть актина и спектрина, подобно той, которая показана в п. *а*; *г* — в мембране мышечных клеток дистрофин связывает актиновые филаменты с интегральным мембранным гликопротеиновым комплексом. Этот комплекс связывается с ламинином и агрином в экстрацеллюлярном матриксе (ECM)

K^+-каналы заякорены к отдельным белкам постсинаптической мембраны.

Сцепление с цитоскелетом транспортных систем, например в скелетной мышце, вероятно, характерно для многих заякоренных мембранных ферментов, чтобы их деятельность была под влиянием натяжения мембраны.

Гипотезу о том, что воротный механизм работы МСК определяется взаимодействием между цитоскелетом и МСК клеток, вы-

сказал в 1986 г. Ф. Сакс (F. Sachs), который ввел модель работы канала такого типа, а расширили ее в 1989 г. Известно, что цитоскелет формируют микротубулы и микрофиламенты, которые представляют собой нестабильные полимеры. Поддерживает полимеризацию обеих структур — микрофиламентов (F-актин) и микротубул (тубулин) — АТФ, тогда как ГТФ — только полимеризацию микротубул. F-Актин микрофиламентов комплексируется с АТФ, а гидролиз АТФ до АДФ эндогенной АТФазой уменьшает стабильность полимера. Микрофиламентная сетка поддерживает натяжение в клетке, которое совместно с микротубулярной жесткостью определяет клеточную форму.

Если вырезанный микроскопический участок мембраны плотно прилегает к отверстию patch-пипетки, закрывая его, то меняя в patch-пипетке давление, можно менять и радиус изгиба мембраны, а следовательно, ее натяжение. Было показано, что у зоны мембраны с различной степенью изгиба развивающееся натяжение мембраны активирует МСК. Так как такой участок мембраны содержит подмембранный цитоскелет (см. рис. 11.7), был сделан вывод, что натяжение мембраны, которое активировало МСК, было передано цитоскелетом. Поскольку формирование микроскопического участка мембраны приводит к разрушению актиновых и тубулиновых нитей цитоскелета, было высказано предположение, что и другие элементы цитоскелета, например спектрин, дистрофин, филамин (см. рис. 11.7), представляют собой структуры, которые передают механическую энергию каналу.

Поскольку существует тесная связь между МСК и цитоскелетом, то неудивительно, что силы, которые развивает, например, suction, воздействуют на МСК через цитоскелетную сеть. В некоторых исследованиях было отмечено выраженное увеличение чувствительности к растяжению МСК после воздействия с соединениями класса цитохалазинов, известными как деполимеризаторы актиновых филаментов. Эти результаты были интерпретированы как указывающие на то, что сеть нитей цитоскелета усиливает натяжение мембраны или передает натяжение мембраны на широко распространенные узловые точки, однако позднее для кардиомиоцитов эти данные были опровергнуты.

Когда МСК были впервые описаны в мышечных клетках, клетки были обработаны деполимеризаторами тубулина и актина для изучения роли цитоскелета в передаче на МСК механического стресса. Было показано, что тубулин не вносил значительного эффекта в передачу механического сигнала, но цитохалазин, деполимеризующий актин, увеличивал канальную чувствительность к растяжению. Следовательно, ни тубулин, ни F-актин не могли рассматриваться как совершенно необходимые для механической чувствительности МСК (вместе с тем связанный с мембраной актин может быть и нечувствительным к цитохалазину). Было

постулировано, что МСК обычно связаны с компонентами цитоскелета мембраны, которые проходят параллельно актиновой сети клетки, так что когда актин деполимеризовался, стресс передавался на связанный с каналом компонент. Сущность этого компонента не была раскрыта. Во всяком случае, это не дистрофин, поскольку МСК активировались и в дистрофических мышечных клетках. По последним данным, полученным на *C. elegance*, предполагают, что МСК, включающие продукты гена *mec-2*, могут быть связаны с тубулином и внеклеточным матриксом.

В исследованиях, выполненных методом patch-clamp в конфигурации whole-cell на кардиомиоцитах желудочков мыши и крысы, было однозначно показано, что цитохалазин D не только сразу уменьшает чувствительность МСК к растяжению мембраны, но и полностью выключает работу этих каналов (рис. 11.8). Разумеется, ингибирование чувствительности МСК к растяжению при деполимеризации F-актина гораздо проще объяснить, чем увеличение чувствительности этих каналов к растяжению. Кроме того, к экспериментам, в которых показано увеличение чувствительности канала, необходимо относиться достаточно осторожно, поскольку при длительной деформации мембраны может регистрироваться ток утечки. Его отсутствие необходимо доказывать отдельно. Однако если выводы на основе описанных экспериментов были

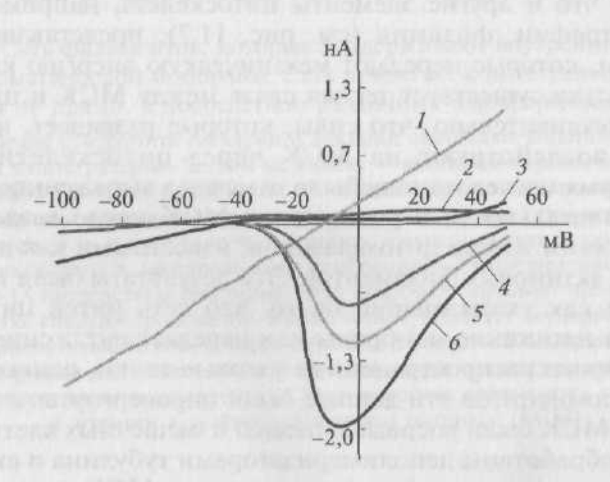


Рис. 11.8. Выключение работы механосенситивных ионных каналов цитохалазином. Показаны вольт-амперные характеристики поздних токов, зарегистрированные до растяжения кардиомиоцита (кривая *3*), на фоне растяжения клетки на 12 мкм (кривая *1*), на фоне растяжения клетки после применения 100 мкмоль/л цитохалазина на протяжении 5 мин (кривая *2*). Кальциевый ток (кривая *6*) уменьшается при растяжении клетки (кривая *5*) и, естественно, еще больше уменьшается при действии цитохалазина (кривая *4*)

правильными, можно представить, что эффект цитохалазина различен для разных типов клеток.

Встраивание реальных и способных к функционированию МСК бактерий в липосомы показывает, что натяжение мембраны может быть прямо передано к каналам через липидный бислой независимо от подлежащей ниже цитоскелетной сети, однако в интактных клетках цитоскелет может модулировать ответ на натяжение мембраны.

Необходимо ли сцепление МСК с цитоскелетом у эукариотов или силы могут быть переданы непосредственно через бислой? В настоящее время нет никакой причины отклонить теорию передачи механического воздействия на МСК через бислой. Кроме того, не имеется никаких данных, чтобы постулировать, что бислой находится под значительным натяжением. Основной довод против наличия существенного натяжения в бислое заключается в том, что константа эластичности зоны patch гораздо меньше, чем у липидных мембран. Поскольку прилипание мембраны к стеклу кончика пипетки приводит к возникновению натяжения покоя в зоне patch, там имеется тенденция к распрямлению «морщин». В результате этого мембрана в зоне patch должна быть более чувствительна к натяжению липида, чем неповрежденная клетка. Тем не менее натяжение, по-видимому, не появляется исходно в бислое. Подобное заключение может быть сделано посредством анализа площади мембраны клетки при swelling на фоне гипотонического стресса.

При swelling увеличение в реальной площади клетки намного больше, чем то, которое можно создать в липидной мембране (3–5 % увеличения площади липидного слоя). Необходимо доказать, что изменения в площади мембраны прежде всего вызваны распрямлением «морщин» мембраны, произведенных цитоскелетом. Хотя имеются (в основном модельные) способы оценить натяжение в неповрежденных клеточных мембранах, все еще невозможно измерить натяжение бислоя при обратимом механическом стрессе таким способом, чтобы определить вклад мембранного натяжения, рожденного бислоем.

Неоднократно было показано, что МСК могут сохранять свою механочувствительность в excised patch, причем электронная микроскопия демонстрирует, что excised patch имеют цитоскелетную структуру. Эти данные позволяют предположить, что элементы мембранного скелета могут требоваться даже в случае excised patch. Еще один аргумент в пользу роли цитоскелета заключается в том, что при patch мембранных blebs—структур, в которых бо́льшая часть цитоскелета разрушена, работа МСК вообще отсутствует, в то время как на неповрежденной смежной мембране функции МСК полностью сохранены. Везикулы, созданные обработкой формальдегидами ооцитов *Xenopus* и сохраняющие часть цитоскелет-

ной структуры, сохраняют (в несколько модифицированном виде) и работу МСК.

Другой вид косвенных свидетельств участия цитоскелета в работе МСК был представлен авторами, которые измерили емкость, эластичность и канальную активность зоны patch. Они показали, что приложенное давление увеличило мембранную емкость. Это увеличение емкости могло быть объяснено потоком липидов в зону patch.

Активность МСК была измерена как функция расчетного натяжения мембраны (с радиусом искривления в зоне patch, взятым как значение, наблюдаемое в световом микроскопе). В этом случае зона patch с различной степенью изгиба имела чувствительность, предполагающую, что натяжение, активирующее каналы, было пропорционально расчетной величине. Константа эластичности зоны patch (≈ 50 дин/см) была гораздо меньшей, чем константа эластичности липидов (≈ 500—1 500 дин/см). Таким образом, натяжение, которое активировало МСК, было, вероятно, передано цитоскелетом. Данные о том, что константа эластичности зоны patch скелетных мышц была нечувствительна к цитохалазину, означают, что актиновые структуры были уже разрушены актом формирования patch и что другие мембранные цитоскелетные элементы, возможно, спектрин, составляют элементы, которые передают механическую энергию каналу.

Роль внеклеточного матрикса в функции МСК была едва затронута. Подавление роста матрикса улучшает формирование patch у линии клеток почки, но не блокирует активацию МСК. Подобные результаты были замечены в гладкой мышце. Эти данные предлагают механическое вовлечение матрикса, но данных, касающихся прямых измерений, нет.

11.1.9. Ингибиторы и активаторы МСК

При фармакологическом подходе было открыто несколько блокаторов МСК, включая Gd^{3+}, амилорид и его производные, катионные антибиотики — стрептоцимицин, канамицин и неомицин, а также различные блокаторы потенциалуправляемых каналов, включая тетродотоксин, тетраэтиламмоний, хинидин, дилтиазем и верапамил. Вместе с тем существует много соединений, которые могут изменять чувствительность МСК, воздействуя на механическое сцепление с каналами. Деполимеризаторы актина — один из примеров.

Гадолиний. Среди известных блокаторов МСК лантаноид Gd^{3+} чаще всего применяют в качестве маркера МСК. Будучи эффективным блокатором этих каналов, Gd^{3+} не полностью специфичен для МСК, как это сообщалось в ранних публикациях. Гадоли-

ний блокирует другие ионные каналы, включая потенциалуправляемые Ca^{2+}-каналы L-типа. Существуют данные, что он блокирует L-тип Ca^{2+}-каналов в клетках нейробластомы и активированные объемом хлорные токи в ооцитах ксенопуса. Мы показали, что Gd^{3+} блокирует L-тип Ca^{2+}-каналов в кардиомиоцитах желудочков человека, морской свинки, крысы и мыши. Но Gd^{3+} блокирует не все МСК. Например, K^{+}-селективные МСК показали себя более стойкими, чем другие.

Несмотря на эти проблемы, Gd^{3+} блокирует много типов МСК. Препарат использовался, чтобы блокировать механически вызванные ответы в целом сердце, которые проходили без блокирования нормальных сокращений. Гадолиний блокировал гравитропную чувствительность у *Euglena*. Чувствительность к Gd^{3+} использовали как тест на вовлечение МСК в процессы растяжения клеток, активации фосфолипазы С, модуляции каналов, активированных антидиуретическим гормоном, и др.

В настоящее время Gd^{3+} рассматривается как наиболее широко применяемый ингибитор самих МСК и механосенситивных токов в конфигурации whole-cell. В этом типе экспериментов было показано, что Gd^{3+} в концентрации менее 10 мкмоль/л уменьшает время открытия МСК, а в концентрации более 10 мкмоль/л полностью блокирует активность этих каналов. В последующих экспериментах было показано, что концентрация Gd^{3+}, при которой полностью блокируется активность МСК, для разных клеток лежит в диапазоне от 10 до 50 мкмоль/л. В наших экспериментах, выполненных на изолированных кардиомиоцитах и сердечных фибробластах, было показано, что Gd^{3+} эффективно блокирует механосенситивные токи в концентрации 5 мкмоль/л.

Как было показано, Gd^{3+} блокирует вызванный растяжением феномен во многих сердечных системах. В предсердии крыс Gd^{3+} по дозозависимому типу подавляет вызванное растяжением высвобождение АНФ в пределах применяемых концентраций от 5 до 80 мкмоль/л, т.е. типичном концентрационном диапазоне для блокирования МСК. Наоборот, органические ингибиторы Ca^{2+}-каналов не предотвращают высвобождения АНФ. В изолированных желудочках собак Gd^{3+}, а не органические ингибиторы Ca^{2+}-каналов блокируют вызванную растяжением аритмию. Эти данные опять подтверждают, что Gd^{3+} не работает в качестве эффективного блокатора потенциалуправляемых Ca^{2+}-каналов, как сообщалось для вентрикулярных миоцитов морских свинок.

Есть данные, что МСК вентрикулярных миоцитов участвуют в регуляции клеточного объема. У цыплят swelling-индуцированный Cl^{-}-ток предшествовал Ca^{2+}-току, который мог быть блокирован Gd^{3+}. Блокирование тока или забуферивание внутриклеточного Ca^{2+} подавляло развитие Cl^{-}-тока и регуляторное уменьшение объема. Swelling-индуцированный Cl^{-}-ток могут контролировать Ca^{2+}-про-

ницаемые МСК, Na^+-проницаемые МСК вместе с Na^+/Ca^{2+}-обменником или вызванная МСК деполяризация, активирующая Ca^{2+}-токи.

У кроликов Gd^{3+} уменьшал изменение объема клетки в гипоосмотическом растворе, в то время как блокатор анионных каналов — 9-антраценкарбоксильная кислота, как и ожидалось, уменьшал сжатие. Эти результаты позволяют предположить, что МСК могут служить промежуточным звеном в регуляции объема сердечных клеток за счет увеличения способности транспортных солей, в основном KCl.

Гадолиний блокирует некоторые механически вызванные эффекты в клетках сердца цыплят: он блокирует механически вызванное увеличение внутриклеточного Ca^{2+} и механически вызванные изменения в ритме сокращений. Эти результаты предоставляют дополнительные свидетельства, что на клеточном уровне МСК участвуют в механической модуляции работы сердца.

Исходя из существующего многообразия МСК, маловероятно, что можно найти универсальный блокатор для всех каналов этого типа, как нет универсального блокатора для потенциалуправляемых или рецепторуправляемых ионных каналов. Кроме его недостаточной избирательности Gd^{3+} также имеет проблему преципитации физиологических анионов типа HCO_3^- и PO_4^{-2}, поэтому должен использоваться с более инертными буферами типа HEPES.

Подчеркнем еще раз, что чувствительность к Gd^{3+} не служит надежным тестом для идентификации МСК. Эффект блокирования может состоять из двух компонентов: блока открытого канала и/или комплексного ответа более высокого порядка.

Гадолиний действует на широкий спектр МСК. Удивительно, что это единственный агент, который влияет и на МСК бактерий проницаемостью 3 нСм и на МСК эукариотных клеток проницаемостью 25 пСм. Гадолиний имеет кристаллический радиус Ca^{2+}, но он трехвалентен и, следовательно, может быть эффективен как вещество, влияющее на натяжение мембраны. Возможно, что действие Gd^{3+} осуществляется вообще не на белок канала, а на липидное окружение, стягивая липиды, так что мембрана, окружающая МСК, *резко меняет свои механические свойства*. Было бы интересно исследовать эффект Gd^{3+} на эластические свойства фосфолипидных мембран на каналлипидное взаимодействие.

Амилорид. Амилорид и его производные использовали, чтобы блокировать МСК. В миллимолярном диапазоне амилорид блокирует МСК у кохлеарных клеток, катионные МСК в ооцитах ксенопуса и K^+-селективные МСК в нейронах моллюсков. Связывание амилорида имеет коэффициент Хилла 1,5—1,8; это означает, что связана более чем одна молекула; связывание также показывает небольшую чувствительность к потенциалу. Некоторые про-

изводные амилорида более эффективны, чем исходное соединение, и предложены как инструмент идентификации ответов клеток, являющихся результатом активации МСК. Амилорид, очевидно, неселективен, так как он блокирует обменники, включая Ca^{2+}/Na^{+}- и Na^{+}/H^{+}-обменник. Некоторые обменники он блокирует в наномолярном диапазоне. Подобно Gd^{3+} амилорид более полезен для биофизического анализа МСК, чем в качестве физиологического инструмента.

Антибиотики. Многие катионные антибиотики блокируют механическую передачу, а также каналы, включая Ca^{2+}-каналы. Есть несколько сообщений об эффектах блокирования антибиотиками МСК. Показано, что в сосудистых клетках морских свинок стрептомицин (блокатор механосенситивных токов в волосковых клетках) менял вызванное растяжением увеличение внутриклеточного Ca^{2+}, но не модифицировал L-тип Ca^{2+}-токов. При исследовании МСК в мышце было показано, что некоторые антибиотики вызывают состояние субпроводимости, как если бы они не блокировали канал непосредственно, но осуществляли частичный блок для проникающих ионов. Учитывая, что эти агенты заряжены, неудивительно, что блок с помощью этих соединений зависит от потенциала. Сродство различных антибиотиков для МСК в скелетной мышце мыши можно представить следующим образом: дигидрострептомицин, неомицин > гентамицин, амикацин, стрептомицин > канамицин. Блок антибиотиками усложнен стехиометрией более единицы, так что сродство зависит от концентрации. При сравнении экспериментов необходимо отметить, что конкуренция с Ca^{2+} может уменьшать эффективное сродство с антибиотиком.

Пептиды. Возможно, более специфичный блокатор МСК, чем Gd^{3+}, обнаружен в яде паука *Grammastola spatulata*. В сердцах морских свинок, перфузированных по Лангендорфу, природный яд эффективно блокирует вызванную растяжением аритмию и вызванные растяжением изменения в конфигурации потенциалов действия, но не ингибирует сами потенциалы действия. Это соединение блокирует МСК в вентрикулярных клетках цыплят, ооцитах *Xenopus* и GH3-клетках, и блокирует механочувствительные токи в конфигурации whole-cell у свежеизолированных вентрикулярных клеток цыплят. Он также блокирует вызванное гипотоническим swelling повышение внутриклеточного Ca^{2+} в GH3-клетках, что, скорее всего, контролируется SAC. Однако яд не блокирует Ca^{2+}-каналы L-типа в GH3-клетках, входящие Ca^{2+}- или K^{+}-токи аномального выпрямления в вентрикулярных клетках цыплят. Из этого яда был выделен пептидный токсин, проходящий дальнейшие исследования.

Активаторы МСК. Неизвестны четкие активаторы, действующие непосредственно на каналы. Амфипатичные соединения, как об-

суждалось, вероятно, действуют непосредственно не на каналы, а на липидное окружение.

11.1.10. Функциональная классификация МСК

Попытка сгруппировать МСК в функциональную логическую схему встречает определенные трудности. Рассмотрим свойства, которые характеризуют МСК, и обсудим вопрос о том, как МСК могут быть вовлечены в физиологическую регуляцию мембранного транспорта.

Катионные SAC. Катионные SAC были идентифицированы в клетках самых разнообразных тканей. Несмотря на то что исследо*ванные ткани разные по происхождению, обнаруженные катион*ные SAC имеют много общих характеристик. Эти каналы исключительно катионселективные. Их единичная канальная проводимость лежит в диапазоне от 25 до 35 пСм (в растворах Na^+ и K^+). Они проницаемы как для одновалентных, так и для двухвалентных катионов. Последнее свойство позволяет Ca^{2+} входить внутрь клетки в течение ее растяжения. Катионные SAC всегда блокируются микромолярной концентрацией Gd^{3+}.

Регуляция клеточного объема. При передаче механического стресса значительная возможность проницаемости Ca^{2+} через катионные SAC повышает роль этих катионов в качестве вторичного мессенджера в регуляции ионного транспорта, который может быть особенно важен для регуляции объема клетки. В хориоидном сплетении при стимуляции катионных SAC посредством гипотонического шока осуществляется вход Ca^{2+}, что приводит к повышению концентрации цитозольного Ca^{2+} до микромолярного уровня. Это вызывает активацию Ca^{2+}-зависимых maxi-K^+-каналов.

Катионные SAC также участвуют в гипотонической активации двух типов K^+-каналов у эпителиальных клеток: Ca^{2+}-зависимого K^+-канала с небольшой проводимостью (15 пСм) в клетках почки опоссума и K^+-канала с большой проводимостью (150 пСм) в культуре клеток из толстого восходящего отдела петли Генле почек. Растяжение и осмотическая активация обоих каналов предположительно зависят от внеклеточного Ca^{2+}.

Хотя Ca^{2+}, по-видимому, важен для нормальной регуляции изменения объема у различных эпителиальных клеток, флюоресцентные измерения цитозольного Ca^{2+} в клетках проксимальных канальцев почки кролика в условиях их swelling показывают, что изменения свободного внутриклеточного Ca^{2+} при swelling слишком малы, чтобы активировать Ca^{2+}-зависимые maxi-K^+-каналы.

Другая проблема, связанная с катионными SAC как регуляторами объема клетки, заключается в том, что эти каналы позволяют Na^+ входить в клетку, а K^+ выходить из нее. Любой значитель-

ный вход Na^+ будет компенсировать эффект Ca^{2+}-зависимого K^+-выхода при регуляции объема клетки. Один путь в рамках этой проблемы может быть в виде использования клеткой Ca^{2+} как «биологического усилителя». В этом случае сравнительно небольшой вход Ca^{2+} будет способствовать большому выходу K^+. Большая зависимость maxi-K^+-канала от Ca^{2+} делает его возможным кандидатом для такой «усиливающей системы». Однако система, контролирующая регуляцию объема клетки, может также требовать определенного уровня Na^+ в клетке.

Проницаемость Ca^{2+} через катионные SAC также может регулировать хлорные токи, особенно важные при гипотонической регуляции объема клетки. Выявление нескольких типов Ca^{2+}-активируемых хлорных токов в ооцитах ксенопуса повышает возможность того, что регуляция объема клетки у ооцитов опосредована swelling-вызванной Ca^{2+}-проницаемостью через SAC.

Морфогенез. В противоположность ооцитам речных животных ооциты морских животных (таких как *Boltenia villosa*) не подвергаются гипотоническому стрессу, характерному для пресноводной овуляции. Существование тех же самых катионных SAC в ооцитах как речных, так и морских животных предполагает, что МСК могут иметь функции, не только связанные с регуляцией объема клетки. Отмечается, что МСК могут быть важны в цитокинетических процессах, связанных с морфогенезом и эмбрионным развитием. Изменения в форме клеток, которые появляются в процессе развития эмбрионов, сопровождаются достаточным увеличением натяжения мембраны и могут индуцировать вход Ca^{2+} через катионные SAC. Вход Ca^{2+} через эти каналы, вызывающий освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ, может запускать сокращение цитоскелетных элементов, которое имеет важное значение для морфогенетического движения, связанного с гаструляцией. Например, существуют доказательства того, что вход Ca^{2+} через катионные SAC стимулирует сокращения, которые вызывают смыкание краев нервной трубки в развивающихся ооцитах.

Сравнительно высокая плотность SAC может быть важна не только для входа Ca^{2+} в течение цитокенеза. Катионы, входящие через SAC, могут значительно деполяризовать ооцит, чтобы осуществить дальнейший вход Na^+ и Ca^{2+}, но уже через потенциалуправляемые каналы.

Эндотелий капилляров. Катионные SAC могут быть также вовлечены в передачу механических сил в сосудах. Изучение культивируемых эндотелиальных клеток из аорты свиньи выявило в их мембране катионселективные каналы с единичной канальной проводимостью, варьировавшей от 39 пСм в стандартном солевом растворе до 19 пСм в растворе, в котором Ca^{2+} был основным токопереносящим ионом. Подобные катионные SAC были описаны в клетках, изолированных из коронарной артерии свиньи, в кото-

рых единичная канальная проводимость варьировала от 36 пСм в нормальном калиевом растворе до 11 пСм в растворе с высокой концентрацией Ca^{2+}. Это повышает возможность того, что изменения давления крови и, следовательно, механическое воздействие на эндотелий капилляров при протекании через них крови достаточны, чтобы привести катионные SAC в открытое состояние. Сравнительно высокая селективность этих каналов ($P_{Ca}/P_{Na} = 6$) может обеспечить достаточный вход Ca^{2+}, чтобы стимулировать синтез и освобождение эндотелиальных факторов, осуществляющих вазодилатацию.

Остеобласты и хрусталик. Остеобласты на поверхности костного матрикса представляют собой инструмент синтеза костных матриксных протеинов. Клональные UMR-106-клетки, происходящие из остеогенных саркомных пассажей крыс, имеют единичную канальную проводимость, равную 18 пСм. Их SAC способны проводить Ba^{2+} и Ca^{2+} в клетку. Эти каналы потенциалнезависимые. Их чувствительность к натяжению мембраны предполагает определенную роль в регуляции объема клетки или регулирует костный метаболизм в ответ на механический стресс. Находка трех типов SAC в остеобластах остеосаркомы G292 человека совпадает с этим предположением.

Также SAC были найдены в препаратах хрусталика амфибий. Их ионная селективность одинакова с селективностью катионных SAC, но единичная канальная проводимость немного выше (50 пСм по сравнению с 20—30 пСм других катионных SAC). Поскольку эти чувствительные к растяжению каналы есть только в хрусталике, им было присвоено название CAT-50. Эти каналы могут играть роль в образовании катаракты, потому что любое увеличение давления активирует CAT-50 в хрусталике и позволяет ненормальному количеству Na^{+}, Ca^{2+} и воды входить в клетку. Вход Na^{+} также деполяризует хрусталик, что должено приводить к увеличению движущей силы для выхода K^{+}. Увеличение Na^{+} и уменьшение K^{+} наблюдаются при многих типах катаракт.

Растительные клетки. Типы SAC найдены у клеток растений и грибов. Эти каналы могут играть определенную роль в геотрофическом ответе растений из-за селективного проникновения Ca^{2+} внутрь клеток, который необходим для ориентации корней. Данные о том, что микромолярная концентрация Gd^{3+} блокирует этот ответ, позволяют предположить, что SAC растительных клеток подобны катионным SAC клеток животных.

Более высокая проводимость катионных SAC была показана у мембраны грибов *Uromzces*. Эти МСК проницаемы для двухвалентных катионов и блокируются низкой концентрацией Gd^{3+}, но имеют единичную канальную проводимость 600 пСм. Эта величина более чем в 20 раз превышает проводимость большинства катионных SAC у клеток животных. Эти МСК, вероятно, не могут

быть вовлечены в регуляцию объема клеток, но, по-видимому, очень важны для осуществления специфических функций грибов. Эти SAC растений в большей степени вовлечены в передачу топографических и геотрофических сигналов, чем в участие клеточного гомеостаза. У высших растений МСК могут конвертировать механические (т.е. гравитационные) сигналы, вызывая увеличение цитозольного Ca^{2+} и таким образом приводя мембранные киназы к селективному фосфорилированию специфических транспортеров гравитропных гормонов.

Калиевые SAC. В добавление к большой группе катионных SAC из семьи МСК есть меньшая группа МСК, которая менее широко распространена среди различных видов, но более селективна для ионов. Эти SAC, демонстрирующие особую селективность для ионов K^+, обозначаются как SAC_K и могут быть сгруппированы в два больших класса на основе их чувствительности к Ca^{2+}.

Ca^{2+}-несенситивные SAC_K. Хлопающие SAC_K с двумя открытыми и тремя закрытыми состояниями были описаны в клетках сердец моллюсков. Спонтанная активность этих SAC_K в отсутствие приложенного растяжения демонстрирует возможность их вклада в нормальный мембранный потенциал. Отрицательное давление в пипетке (suction) до 25 мм рт. ст. значительно увеличивает P_o этих каналов без изменения их селективности или единичной канальной проводимости, равной 33 пСм.

Два типа SAC_K были найдены в базолатеральной мембране проксимальных канальцев почки *Necturus*:

1) хлопающие SAC_K с коротким временем открытия (a short open-time flickery), проводимостью около 45 пСм и средним временем открытия в пределах 1,5 мс;

2) SAC_K с длительным временем открытия (a longer open-time), проводимостью около 30 пСм и средним временем открытия 40—50 мс.

Кроме того, они могли быть активированы посредством suction. Эти K^+-каналы были также чувствительны к осмотическому swelling. Гипоосмотический раствор увеличивает P_o без изменения в проводимости или канальной селективности в K^+-деполяризованных клетках, так же как и в клетках, находящихся в растворе, где основным токопереносящим ионом был Na^+ (в растворе Рингера). Так как гипотоническая регуляция объема клетки зависит от выхода клеточных катионов, любые каналы со значительной селективностью для $K^+ > Na^+$ должны быть полезны в сохранении клеточного объема.

Ca^{2+}-сенситивные SAC_K. Известны препараты, у клеток которых есть maxi-K^+-каналы, демонстрирующие различную степень чувствительности к растяжению. Эти каналы имеют зависимость от потенциала и обладают Ca^{2+}-чувствительностью, но также отвечают прямо на увеличение натяжения мембраны, даже когда кон-

центрация Ca^{2+} точно контролируется. Maxi-K^+-каналы были идентифицированы на апикальной мембране клеток кортикальных собирательных трубочек почек крыс и кроликов и реагировали независимо на три воздействия — потенциал, цитозольный кальций и растяжение мембраны.

Механосенситивные $K^+(Ca^{2+})$-каналы были описаны в линиях остеобластов и гладкомышчных клетках легких. В экспериментах на гладкомышечных клетках легких четыре определенных стимула были эффективны для увеличения P_o этих K^+-каналов с большой проводимостью: цитозольный Ca^{2+}, клеточная деполяризация, растяжение мембраны и экзогенные жирные кислоты, причем эффект растяжения не определялся Ca^{2+}. Это было продемонстрировано посредством suction в сериях exided (insided-out) patch с 5 ммоль/л EGTA и без добавления Ca^{2+} в пипеточный и перфузионный растворы. Интересно, что эти каналы были также активированы жирными кислотами посредством механизма, который, по-видимому, не включает образование биологически активных метаболитов, фосфорилирование или Ca^{2+}. Этот эффект повышает возможность того, что увеличение натяжения мембраны стимулирует связанные с мембраной фосфолипазы, чтобы освободить эндогенные жирные кислоты, которые затем активируют эти каналы.

Анионные МСК. Анионные МСК не так широко представлены, как катионные SAC или SAC_K. Большинство анионных МСК имеют высокую проводимость более 300 пСм. Помимо механического стресса эти каналы часто являются объектами регуляции со стороны специфических химических соединений. Например, анионселективные МСК с проводимостью 305 пСм были описаны в клеточных линиях (RCCT-28A), которые имели фенотип клеток кортикальных собирательных трубочек почки. Оба типа воздействия — suction и гипоосмотические растворы — активировали эти каналы, что предполагает их вовлечение в гипоосмотическую регуляцию объема клетки. Кроме того, помещение этих клеток в дигидроцитохалазин В значительно увеличивает чувствительность этих каналов к механическому стрессу.

Особенно важны эксперименты по идентификации и встраиванию в липосомы двух бактериальных МСК из сферобластов *Escherichia coli*: неселективный канал с большой проводимостью (3 000 пСм), обозначенный как MscL, и анионселективный канал с низкой проводимостью (900 пСм), обозначенный как MscS. Последний подобен МСК с проводимостью 650—970 пСм, которые могут быть важны у *Escherichia coli* для регуляции объема. Каналы MscS также активируются амфипатичными соединениями посредством механизма, связанного с их механосенситивностью.

Каналы MscL были клонированы и идентифицированы как сравнительно небольшие (136 аминокислот) белки, которые оп-

ределяют механосенситивную активность, когда они встроены в липосомы. Таким образом, сами эти протеины, по-видимому, содержат полную систему для передачи натяжения мембраны, что влияет на возможность открытия канала. Это может открыть путь для понимания уникальной структуры, требующейся для механосенситивности у разных типов МСК.

Неселективные SAC и SIC. Неселективные SAC (SAC_{NS}), которые демонстрируют небольшое различие между анионами и катионами, сравнительно редки у эукариотных клеток. Возможно, их лучшие примеры у высших животных — это $МСК_{NS}$ с единичной канальной проводимостью в 22 пСм, найденные в клетках почки опоссума. Эти каналы были легко активированы suction или гипотоническим шоком и показали значительную проницаемость как для Ca^{2+}, так и для одновалентных ионов. Эти каналы могут играть важную роль в регуляции объема клеток почки.

Неселективные каналы более общие у бактерий и дрожжей. Очень высокая проводимость (3 000 пСм) MscL канала *Escherichia coli* (см. ранее) может быть противопоставлена более низкой проводимости (36 пСм) неселективных каналов в плазменной мембране дрожжей. Эти данные были получены двумя методами: на уровне whole-cell и на уровне исследования единичных каналов. Хотя эти каналы у дрожжей блокируются 10 мкмоль/л Gd^{3+}, отсутствие у них селективности в проведении катионов и анионов и их кинетический ответ на suction выделяют их из семьи катионных SAC среди МСК.

Каналы SIC сравнительно редки, однако в настоящее время уже идентифицированы в клетках дистрофических мышц от *mdx* мышей, клетках гладкой мышцы желудка жабы, у астроцитов, нейронов улиток и предсердных миоцитов. Их присутствие в дистрофических мышцах особенно интригующее, потому что нормальные мышцы содержат большое количество SAC и практически не имеют SIC (2%), в то время как дистрофические мышцы содержат более значительное количество SIC. Значительное P_o и проницаемость для Ca^{2+} у SIC в клетках дистрофической мышцы могут определять повышение Ca^{2+}, обнаруженное в миотубулах *mdx* мышей.

Совместно существующие в одних и тех же препаратах SAC и SIC функционируют как некий фильтр, в котором эффективная P_o обоих каналов достигает минимума в пределах узкого диапазона натяжения мембраны. Например, у нейронов улиток K^+-селективные SAC и SIC вместе продуцируют минимальную K^+-проницаемость у клетки со средненормальной (промежуточной) величиной натяжения мембраны. Внутри этого диапазона клетка достаточно деполяризована, чтобы привести потенциалуправляемые Ca^{2+}-каналы в гипервозбудимое состояние. Это может иметь важное значение, например для нейронного роста.

11.1.11. Могут ли МСК продуцировать значительные токи в клетке?

Ранее было высказано предположение, что процесс образования giga seal искусственно повышает чувствительность МСК к механическим стимулам. Эта гипотеза возникла на основе экспериментов, демонстрирующих недостаток корреляции между активацией единичных МСК и изменением суммарных токов.

Много исследователей изучали это положение, сравнивая единичные каналы и токи whole-cell в одном и том же препарате. Например, inflation сферобластов дрожжей позитивным давлением повышала суммарный ток в размерах, совпадающих с ожидаемым общим током от единичных SAC. Растяжение гладкомышечных клеток демонстрирует входящий ток, который мог быть соотнесен с током через единичные SAC. В клетках печени гипоосмотический стресс активировал Ca^{2+}-проницаемые SAC одновременно с увеличением цитозольного Ca^{2+}. В интестинальных клетках линии I407 гипоосмотический стресс вызывал значительные Gd^{3+}-чувствительные входящие токи, которые коррелировали со входом Ca^{2+}. К сожалению, как отмечалось ранее, Gd^{3+} не является полностью специфическим блокатором для МСК.

С целью компенсации отсутствия высокоспецифических блокаторов для SAC были использованы клетки проксимальных канальцев почки амфибий, у которых все из обнаруженных K^+-каналов, по-видимому, обладают механической чувствительностью. Даже Ca^{2+}-зависимые K^+-каналы с большой проводимостью, выявленные на апикальной мембране клеток кортикальных собирательных трубочек почек, активируются индуцированным растяжением — увеличением концентрации Ca^{2+}, которое происходит через катионные SAC. Так как все K^+-каналы проксимальных канальцев почки лягушки также блокируются 5 ммоль/л Ba^{2+}, изменения в Ba^{2+}-чувствительной проводимости в конфигурации whole-cell (в области негативного мембранного потенциала) отражают активацию единичных SAC_K.

В другой части экспериментов, выполненных на изолированных клетках проксимальных канальцев почки лягушки, было исследовано влияние гликолиза Na^+ и Na^+-фенилаланинсвязанного транспорта на объем клетки и ток в конфигурации whole-cell. Изоосмотическое добавление 40 ммоль/л глюкозы в омывающий раствор увеличивало объем клеток на (23 ± 4) % и увеличивало Ba^{2+}-чувствительную проводимость на (40 ± 10) % в 11 изолированных клетках. Сходные результаты были получены для изоосмотического добавления фенилаланина и для добавления аналогов котранспартируемой неметаболической глюкозы. Во всех случаях swelling-ассоциирующиеся изменения в Ba^{2+}-сенситивной проводимости происходили без изменения в потенциале ревер-

сии. Это свидетельствует о том, что канальная селективность была не изменена.

В другой серии экспериментов клетки проксимальных канальцев почки *Necturus* были электрически разобщены при помощи 0,6 ммоль/л октанола, а затем подвержены внезапному изменению осмолярности в перфузионной камере с одновременной регистрацией тока в конфигурации whole-cell. Уменьшение осмолярности раствора вызывало значительное увеличение в Ba^{2+}-сенситивной whole-cell-проводимости. Поскольку Ba^{2+}-сенситивные SAC_K были идентифицированы на базолатеральной мембране этих клеток, увеличение Ba^{2+}-сенситивной проводимости может быть прямо связано с осмотической активацией этих МСК.

Во всех этих исследованиях временна́я связь между клеточным swelling и увеличением в Gd^{3+}- или Ba^{2+}-сенситивной проводимости прямо не доказывает, что изменение проводимости связано с МСК. Однако в случае K^+-каналов из амфибии можно предположить следующее. Поскольку все K^+-каналы, регистрируемые в клетках проксимальных канальцев почки амфибий, — SAC и Ba^{2+}-сенситивные, глюкозо- и swelling-индуцированный Ba^{2+}-сенситивный суммарный ток может быть отнесен к калиевым SAC.

Приведенные эксперименты и данные о том, что механосенситивность представляет собой прямое свойство определенных каналов, которые могут быть встроены в различное липидное окружение, свидетельствуют против гипотезы о том, что механосенситивность есть артефакт техники patch-clamp. В то же время определенные SAC демонстрируют адаптивный ответ на suction, что наблюдается только с «мягким» seal. Образованные seal при более сильном suction устраняют адаптацию и, возможно, увеличивают чувствительность каналов к растяжению. Таким образом, вполне возможно, что токи через SAC не всегда видны в конфигурации whole-cell, потому что они могут быстро адаптироваться (быстро исчезать), в то время как единичные каналы в cell-attached patch, образованные с достаточным suction, чтобы разрушить адаптацию, будут оставаться чувствительными к натяжению мембраны.

11.1.12. Роль МСК в формировании электрического ответа клетки

Механосенситивные каналы служат для преобразования механических сигналов, возникающих при различных процессах в тканях (в том числе в сердце), в электрические. По современным данным, в основе их проводимости лежит неселективная проводимость для одновалентных катионов и для ионов Ca^{2+}.

На рис. 11.9 суммированы пути, по которым активация катионнеселективных SAC или SIC может преобразовывать механический сигнал в клеточный ответ, особое ударение делается на связи этих МСК с потенциалзависимыми каналами для одновалентных катионов и потенциалзависимыми каналами для Ca^{2+}. Согласно этой схеме при механическом воздействии через неселективные катионные SAC или SIC (*1*) осуществляют вход Na^+ и Ca^{2+}, а через селективные (*2*) — вход Ca^{2+}, что деполяризует клеточную мембрану и повышает внутриклеточную концентрацию этих ионов. Механически индуцированная деполяризация может активировать потенциалуправляемые Na^+-(*3*), K^+-(*4*) или Cl-(*5*) и Ca^{2+}-каналы (*6*). Механически индуцированный вход Ca^{2+} увеличивает внутриклеточную концентрацию Ca^{2+}, и это может приводить, с одной стороны, к Ca^{2+}-индуцируемому входу Ca^{2+} через потенциалзависимые ионные каналы поверхностной мембраны клетки, а с другой — к Ca^{2+}-индуцируемому выходу Ca^{2+} через каналы (*8*) из цистерн саркоплазматического ретикулума. Возможен вклад в увеличение $[Ca^{2+}]_{in}$ со стороны кавеол через гипотетически предположенные МСК (*9*). Эти процессы и далее увеличивают концентрацию Ca^{2+}, что может активировать Ca^{2+}-зависимые K^+-(*7*) или Cl-каналы (*8*). Входящие Na^+- и Ca^{2+}-токи через

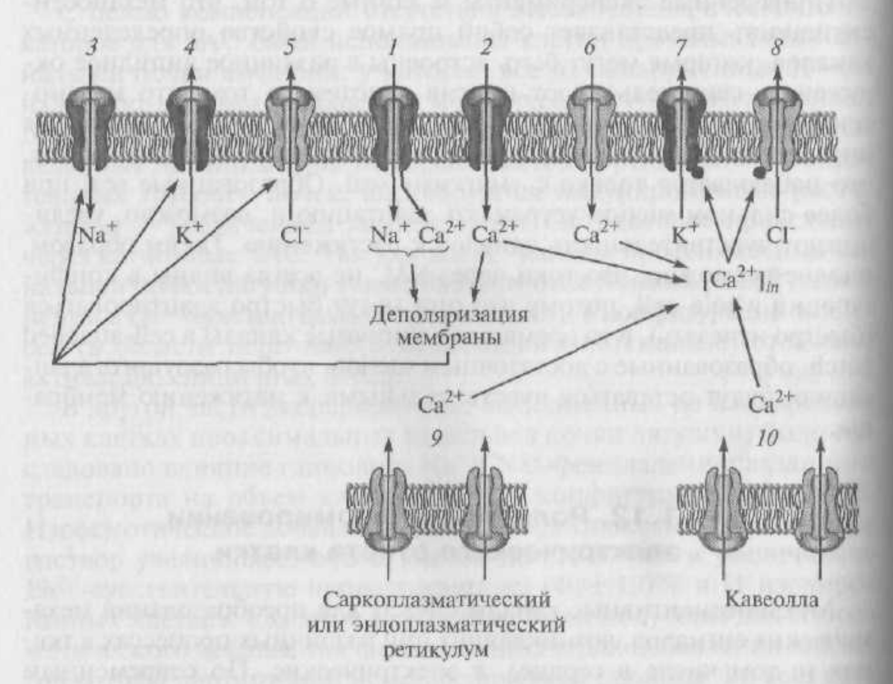


Рис. 11.9. Схема путей преобразования механического раздражения клетки в электрический ответ

потенциалзависимые Na^+- и Ca^{2+}-каналы далее деполяризуют мембрану. Выходящие K^+- или/и Cl^--токи смещают эту деполяризацию. Таким образом, совокупность работы МСК и потенциалуправляемых каналов формирует электрофизиологический ответ клетки. Поскольку запускающим звеном такого ответа служат МСК, поиск их специфических блокаторов приобрел несомненный интерес.

11.1.13. Инактивация механочувствительных токов

В исследованиях одиночных SAC временная инактивация канальных токов наблюдалась во многих клеточных препаратах, но не во всех клетках сердца. Однако инактивация механосенситивных токов в конфигурации whole-cell наблюдалась в изолированных вентрикулярных клетках цыпленка. Инактивация SAC может быть следствием кинетики взаимодействия разных состояний каналов или расслабления цитоскелета, которое передает силу, прилагаемую к каналу, или обоих этих механизмов.

Некоторые вызванные растяжением изменения в неповрежденном сердце так же зависят от ритма, с которым осуществляется растяжение. В сердцах кроликов и желудочках собак вероятность возникновения вызванного растяжением вентрикулярного возбуждения увеличивается с повышением ритма растяжения. У собак растяжение предсердий, вызванное вентрикулярными сокращениями, приводит к фазовым вариациям в длине сердечного цикла, степень которых зависит от скорости механического растяжения сердечной мышцы.

11.2. Механосенситивные каналы, токи и потенциалы кардиомиоцитов

11.2.1. Основные методы растяжения фрагментов ткани сердца и механической деформации изолированных клеток сердца

Хотя наличие МСК показано практически во всех клетках разных органов и тканей, ограничимся обсуждением роли МСК в сердце на примере электровозбудимых кардиомиоцитов и на примере электроневозбудимых сердечных фибробластов. Обсуждение МСК в этих двух группах клеток охватывает практичеки все проблемы, связанные с их функциями. Кроме того, эффективная роль МСК в патологии этого органа делает рассмотрение этих вопросов крайне актуальными. Мы уже частично затрагивали эти во-

просы. Так, мы обратили внимание читателя на часто наблюдаемые неселективные катионные SAC или на комбинации неселективных и K^+-селективных SAC, но не выделяли эффект K^+-селективных SAC в сердце. В некоторых сердечных системах сообщается существование только K^+-селективных SAC. K^+-Селективные SAC должны приводить к совершенно другим по сравнению с неселективными путями эффектам. Фактически в желудочках морских свинок сильное растяжение до 1,4 L_{max} вызывает гиперполяризацию, а не деполяризацию в диастоле. В отдельных более ранних публикациях сообщается о том, что у собак и крыс увеличение давления на правую сторону сердца снижает его ритм. Мы полагаем, что этот результат либо нормального ответа, модифицированного в экспериментальных условиях, либо ответа, наблюдаемого только в отказывающем сердце. Эти необычные наблюдения могут быть объяснены доминированием K^+-селективных SAC, хотя почему при этих условиях их эффекты должны доминировать над эффектом неселективных катионных SAC — не ясно.

Регистрация мембранного потенциала клеток в сердце. Метод внутриклеточного исследования биопотенциалов кардиомиоцитов с помощью стандартных микроэлектродов был использован на спонтанно сокращающихся или искусственно стимулируемых фрагментах ткани сердца при ее растяжении, что позволило зарегистрировать любые изменения потенциала клетки на фоне растяжения ткани. Это достаточно сложный метод, поскольку необходимо относительно длительное время удерживать микроэлектрод не только в сокращающемся, но и одновременно в растягиваемом фрагменте сердца. Этот метод был применен в совместных исследованиях научной группы в составе А. Камкина и И. Киселевой (Россия) с коллегами из Германии и Великобритании. Ткань сердца, например предсердие или фрагмент желудочка, укрепляли между механоэлектрическим преобразователем и устройством для растягивания ткани, например цифровым микроманипулятором (рис. 11.10). Анализу подвергали величину потенциала покоя клетки, амплитуду потенциала действия (AP) и величины APD25, APD50, APD90 (action potential duration на уровне 25, 50 и 90 % фазы реполяризации потенциала действия). Применяемая в этом случае блок-схема аппаратуры приведена на рис. 11.10.

В установке механоэлектрический преобразователь *1* крепится к микроманипулятору, позволяющему перемещать его в трех плоскостях и жестко фиксировать в выбранной позиции. Чувствительный элемент — штырь *2* — присоединяется через клемму *3* к сокращающемуся фрагменту ткани *4*, находящемуся в перфузионной камере *6*. Выход механоэлектрического преобразователя соединен со входом измерительного блока, выход которого подсоединен к входу магнитофона. Растягивающий ткань цифровой мик-

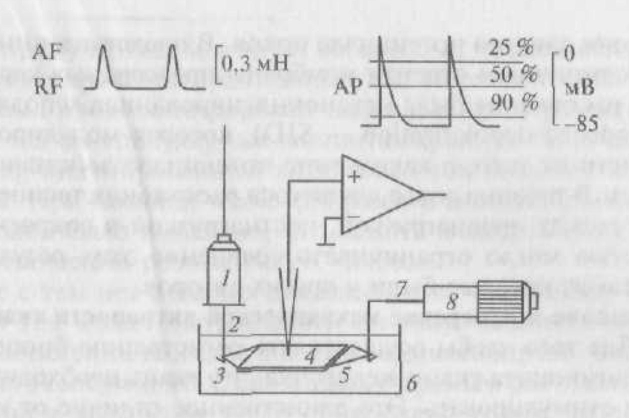


Рис. 11.10. Блок-схема электронно-измерительной аппаратуры для регистрации сократительной активности фрагментов предсердий или желудочков и их механической стимуляции:

1 — механоэлектрический преобразователь; *2, 7* — штырь; *3, 5* — клемма; *4* — фрагмент ткани; *6* — перфузионная камера; *8* — цифровой микроманипулятор; величины resting force (RF) и active force (AF) регистрируют механоэлектрическим преобразователем, а параметры потенциала действия (AP) — при помощи стандартной микроэлектродной техники

романипулятор *8* штырем *7* соединяется через клемму *5* с фрагментом ткани.

Растяжение и измерение механической активности ткани предсердий. Во время регистрации биопотенциалов кардиомиоцита спонтанно сокращающуюся ткань правого предсердия растягивали при помощи цифрового микроманипулятора (см. рис. 11.10), регистрируя степень растяжения в микрометрах и одновременно регистрируя посредством механоэлектрического преобразователя изменение величины resting force и active force. Под понятием «resting force» подразумевают изометрическую силу, регистрируемую у несокращающейся мышцы (или в период между сокращениями), которая одним концом прикреплена к механоэлектрическому преобразователю, а другой ее конец зафиксирован. При растяжении мышцы со стороны точки фиксации можно измерять величину resting force в зависимости от величины растяжения. Active force — изометрическая сила, регистрируемая у мышцы в период сокращения. При этом мышца одним концом прикреплена к механоэлектрическому преобразователю, а другой ее конец зафиксирован.

В экспериментах с внутриклеточной регистрацией биопотенциалов использовали длительное растяжение ткани, которое осуществлялось с медленной скоростью растяжения. Этот принцип был применен, поскольку показано, что амплитуда растяжения является более важным фактором, чем его продолжительность при

регистрации сдвигов потенциала покоя. В представленных экспериментах типичным ответом мембраны предсердных кардиомиоцитов на растяжение была механоиндуцированная деполяризация (stretch-induced depolarization — SID), которая модулировалась в зависимости от того, в каком типе потенциала действия она наблюдалась. В течение долго длящегося растяжения тесное взаимодействие между преднагрузкой, постнагрузкой и сократительной активностью могло ограничивать сравнение этих результатов с результатами, которые были у других авторов.

Растяжение и измерение механической активности ткани желудочков. Для того чтобы осуществлять регистрацию биопотенциалов кардиомиоцита ткани желудочка, эту ткань необходимо электрически стимулировать. Это единственное отличие от изложенного метода, применимого для ткани предсердий. Хотя полоски гипертрофированного левого желудочка сердца от животного, перенесшего инфаркт миокарда, проявляли в большинстве случаев спонтанные сокращения в разном ритме. Как и в предыдущем случае, сокращающуюся ткань желудочка растягивали при помощи цифрового микроманипулятора. Однако из-за толщины стенки желудочка регистрация степени растяжения в микрометрах была бессмысленной и эффект растяжения миокарда оценивали по увеличению амплитуды active force (механизм Старлинга). В представленных экспериментах типичным ответом мембраны желудочковых кардиомиоцитов на растяжение также была SID, которая модулировалась в зависимости от того, в каком типе потенциала действия она наблюдалась.

Swelling как метод механического воздействия на клетку. Применение осмотического swelling или раздувания клетки (путем введения в нее раствора из patch-пипетки посредством подачи внутрь этой пипетки положительного давления) в конфигурации whole-cell на изолированных кардиомиоцитах взрослых животных выявило так называемый swelling-индуцированный хлорный ток. Этот ток был описан во всех типах миокардиальных клеток у млекопитающих, в том числе в предсердных клетках собаки, морской свинки, вентрикулярных миоцитов кошки, миоцитов кролика, вентрикулярных и атриальных миоцитов собаки, включая человеческое предсердие и желудочек. Кроме того, swelling-индуцированный хлорный ток зарегистрирован к культуре эмбриональных миоцитов сердца цыпленка, где также было показано, что этот тип тока модулирует F-актин. Не ясно, однако, должен ли swelling-индуцированный ионный ток хлора (т.е. ток, меняющийся при изменении объема клетки) рассматриваться как ток SAC, поскольку некоторые из swelling-индуцированных токов могут вызываться вторичным механизмом. Признавая свой возможный консерватизм, некоторые исследователи полагали, что эти токи не вызваны SAC, хотя SAC могут и вкладывать что-то в ответ клетки.

На вентрикулярных миоцитах собаки был продемонстрирован swelling-индуцированный катионный ток. Неселективный катионный ток был продемонстрирован также и в предсердных клетках человека. На вентрикулярных миоцитах кролика было показано, что swelling-индуцированный катионный ток является Gd^{3+}-сенситивным. При помощи whole-cell patch и ионселективных микроэлектродов было выявлено, что осмотический swelling эффективен в отношении работы Na^+/K^+-насоса.

Вместе с тем нет никаких доказательств, что swelling-индуцированный ток может быть аналогичен току, возникающему при прямом растяжении или сдавливании кардиомиоцитов. Более того, в недавних экспериментах, связанных с прямым растяжением или сдавливанием клеток, не было обнаружено токов, аналогичных swelling-индуцированным. Таким образом, swelling-индуцированные токи не связаны с работой SAC.

Моделирование роли SAC в модуляции AP кардиомиоцитов. Было предположено, что возможный ток через SAC деполяризует мембрану в диастоле и гиперполяризует в течение плато. Многие экспериментальные результаты могут быть объяснены с позиций этого механизма.

Изменение внутриклеточного ионного состава, которое происходит в результате проведения ионов через SAC, может запускать вторичные события. Такими ионами могут быть Ca^{2+}, Na^+ и K^+, но Ca^{2+} наиболее вероятен. Это важный внутриклеточный мессенджер, который может активировать или инактивировать Ca^{2+}-активируемые каналы мембраны. Показано, что в эндокардиальном эндотелии в правом предсердии имеется катионселективный тип SAC, который проницаем для Ca^{2+}, и существуют Ca^{2+}-активируемые K^+-каналы. Подобные результаты сообщены для гладких мышц, где активация SAC ведет к фазической активности клетки путем активации Ca^{2+}-активируемых K^+-каналов. Повышение внутриклеточного Na^+ может изменять работу Na^+/K^+-насоса и Na^+/Ca^{2+}-обменника.

Модельные исследования предполагали, что вход Ca^{2+} через SAC достаточен, чтобы активировать Ca^{2+}-активируемые K^+-каналы. Основываясь на этом, было создано несколько математических моделей, пытающихся объяснить накопленные к тому времени экспериментальные данные.

Первая попытка симулировать влияние активации SAC на AP кардиомиоцитов была выполнена Ф.Саксом, который рассчитал ток через SAC в вентрикулярной клеточной модели, выполненной на базе данных, характерных для кардиомиоцитов морской свинки. Ток через SAC был представлен согласно формуле

$$I_{SAC} = (|V - V_{rev}|\gamma \rho A)/1 + K e^{-\alpha(L - L_0)},$$

где V — мембранный потенциал; A — площадь клетки; K — равновесная константа, контролирующая количество тока при L_0; L — длина саркомера; α — параметр чувствительности.

Длина саркомера была использована как *мера растяжения* (strain) клетки, хотя кортикальное мембранное напряжение (tension) — более правильный параметр для проницаемости, потому что кортикальное мембранное напряжение, возможно, пропорционально саркомерной длине (во всяком случае, в диастоле). Параметры SAC были взяты из результатов, полученных методом изучения единичных каналов и токов в конфигурации whole-cell на вентрикулярных клетках эмбрионов цыплят. Потенциал реверсии был взят как –20 мВ, проводимость SAC как 25 пСм и их *канальная плотность* 0,3/мкм^2. *Симулированный потенциал действия* желудочков хорошо совпал с экспериментальными наблюдениями: ранняя фаза реполяризации (начало плато) была понижена и укорочена, а поздняя фаза реполяризации была удлинена. Модель также успешно симулировала и воспроизводила варианты других экспериментальных наблюдений.

Изучение принципов возникновения потенциала действия под влиянием механического фактора осуществлено и на других моделях. У кардиомиоцитов крыс растяжение мембраны путем создания *отрицательного давления в patch-пипетке* вызывало запуск потенциала действия. Модельные исследования подтвердили, что ток через небольшое число SAC может вызвать достаточные изменения (0,2 пСм в течение 50 мс), чтобы запустить потенциал действия в кардиомиоцитах. Так, у свежеизолированных кардиомиоцитов желудочка цыпленка создание отрицательного давления в patch-пипетке модулировало клеточное сокращение независимо от того, содержал ли раствор в patch-пипетке Na^+ или K^+ как доминирующие катионы.

Результаты, полученные на моделях, демонстрировали, что именно работа SAC определяет механически вызванные электрические изменения в сердце.

Регистриция механоиндуцированного тока у клеток сердца. Исследование ионных токов, протекающих через мембрану при том или ином механическом стрессе клетки, исследовали на изолированных кардиомиоцитах методом patch-clamp в конфигурации whole-cell. Пример оригинальной кривой при регистрации ионных токов от изолированного кардиомиоцита желудочка в конфигурации whole-cell с раствором Тироде в перфузионной камере и patch-пипетке представлен на рис. 11.11.

Для получения этой кривой у кардиомиоцитов потенциал поддерживали на уровне –45 мВ и проводили его смещение импульсным током длительностью 140 мс до 0 мВ. На уровне поддерживаемого потенциала, величиной –45 мВ, регистрировали отсутствие тока через мембрану клетки. При смещении мембранного

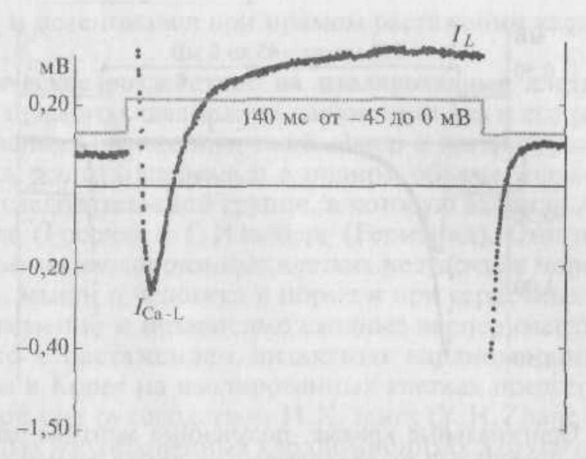


Рис. 11.11. Входящий Ca^{2+}-ток через L-тип Ca^{2+}-каналов (I_{Ca-L}) и выходящий K^+-ток рабочего кардиомиоцита мыши, зарегистрированный методом patch-clamp в конфигурации whole-cell при смещении мембранного потенциала до 0 мВ относительно поддерживаемого потенциала величиной –45 мВ. Поздний ток, исследуемый при растяжении клетки, обозначен как I_L и определяется на последних 10 мс смещающего потенциала. Na^+-ток подавлен поддерживаемым на уровне –45 мВ потенциалом

потенциала до 0 мВ регистрировали входящий I_{Ca-L}-ток, т.е. ток через L-тип Ca^{2+}-каналов, и далее K^+-токи, в состав которых входит поздний I_L-ток. После окончания импульса электрического тока вновь регистрировали полное отсутствие тока через мембрану.

Поскольку ток через МСК — входящий ток, выходящие K^+-токи блокировали ионами Cs^+, а входящий Na^+-ток подавляли поддерживаемым на уровне –45 мВ потенциалом и на этом фоне изучали изменение тока при поддерживаемом потенциале и поздний I_L-ток.

На рис. 11.12 показаны оригинальные кривые, полученные методом patch-clamp в конфигурации whole-cell на кардиомиоците желудочка до его растяжения (кривая *1*) и после его растяжения (кривая *2*). Из рисунка следует, что растяжение кардиомиоцита приводило к смещению в негативную область тока, возникающего при поддерживаемом потенциале. Это свидетельствует о наличии входящего тока через МСК.

Механосенситивные ионные токи при прямом растяжении клетки. Доказательство существования механосенситивных ионных токов и их изучение возможны только путем измерения при прямом растяжении клетки, однако растянуть изолированный кардиомиоцит очень трудно. До 2000 г. было только одно короткое успешное сообщение. Используя свежеизолированные вентрикулярные клет-

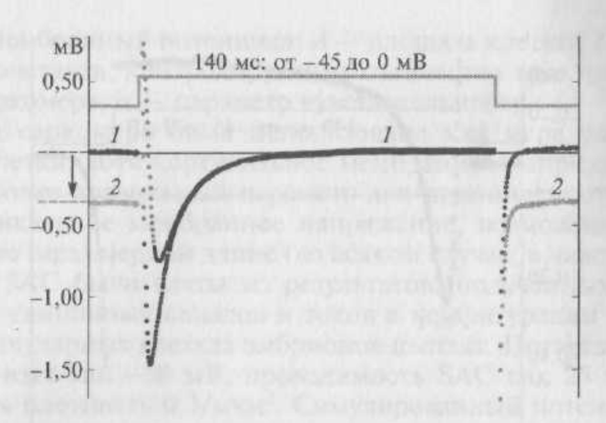


Рис. 11.12. Оригинальные кривые, полученные методом patch-clamp в конфигурации whole-cell на кардиомиоците левого желудочка морской свинки до его растяжения (кривая *1*) и после его растяжения (кривая *2*). Смещение тока при поддерживаемом потенциале показано стрелкой. Представлены L-тип Ca^{2+}-тока и поздний ток (I_L), причем компонент K^+-тока в позднем токе подавлен ионами Cs^+. Na^+-ток подавлен поддерживаемым на уровне –45 мВ потенциалом. Мембранный потенциал смещался от поддерживаемого потенциала –45 мВ до 0 мВ

ки морской свинки и стандартный физиологический раствор в перфузионной камере и patch-пипетке, авторы зарегистрировали в конфигурации whole-cell механосенситивный ток с реверсным потенциалом –15 мВ. Вследствие трудностей регистрации результаты были получены только на нескольких клетках.

Также применили другой прием. Используя перфоративный patch для регистрации мембранного тока на вентрикулярных клетках сферической формы эмбриона цыпленка, придавливали клетки, используя вторую пипетку. Полагали, что это трансформирует сферические клетки в клетки другой формы, но эквивалентного объема. Постулировали сравнительное увеличение зоны клеточной мембраны на 5 %, которое приводит к кортикальному напряжению менее 1—3 дин/см, зависящему от зоны эластической константы кортекса клетки. Это сдавливание эффективно растягивает кортекс клетки. Было показано, что амплитуда механосенситивного тока увеличивалась в зависимости от величины стимуляции. В физиологических условиях ток имел линейную *I*—*V*-кривую с реверсным потенциалом, равным –17 мВ, и определялся преимущественно Na^+ и K^+. Допустили наличие двух типов SAC: K^+-селективных и катионселективных.

Однако, как отмечалось, только прямое растяжение изолированного кардиомиоцита взрослого животного позволяет впрямую исследовать токи через SAC. В 2000 г. были впервые опубликованы исследования, посвященные изучению механосенситивных ион-

ных токов и потенциалов при прямом растяжении кардиомиоцитов.

Механическое воздействие на изолированные клетки сердца. Проблему прямого сдавливания кардиомиоцита и его растяжения в исследованиях с помощью patch-clamp в конфигурации whole-cell удалось решить впервые и в полном объеме только в 1999—2000 гг. исследовательской группе, в которую входили А. Камкин, И. Киселева (Россия) и Г. Изенберг (Германия). Они выполнили эксперимент на изолированных клетках желудочков морской свинки, крысы, мыши и человека в норме и при сердечных патологиях. Одновременно и независимо сходные эксперименты (связанные только с растяжением интактных кардиомиоцитов) были выполнены в Корее на изолированных клетках предсердий научной группой под руководством И. Х. Занга (Y. H. Zhang) и в США на интактных изолированных кардиомиоцитах желудочков крысы группой Ф. Сакса, Г. С. Л. Бетта (G. C. L. Bett) и Т. Зенга (T. Zeng). Последняя работа, однако, была выполнена с рядом допущений. Авторы не смогли осуществить регистрацию тока на фоне растяжения от свежеизолированных клеток в нормальном растворе Тироде, поэтому использовали раствор, не содержащий Ca^{2+}. В некоторых экспериментах авторы добавляли Ca^{2+}, но в крайне низкой концентрации (0,2 ммоль/л). В этом случае все клетки в условиях экспериментов находились в «расслабленном» состоянии, что не позволяет однозначно трактовать полученные результаты.

Несмотря на значительные сложности, только методика прямого растяжения и сдавливания кардиомиоцитов позволяет впрямую оценить механическое влияние на клетку, соотнесенное к реальному процессу ее растяжения и сжатия в целом сердце. Технически существует несколько способов сжатия и растяжения клеток сердца. Для сжатия применяют стеклянные палочки с различной конфигурацией кончика, которые позволяют локально и на разном по величине участке клетки осуществлять ее сдавливание при одновременной регистрации тока. При подсоединении стеклянной палочки к микроманипулятору с цифровой индикацией возможно оценить степень сдавливания клетки, хотя оптимальный результат дает подсоединение палочки через механоэлектрический преобразователь, что позволяет регистрировать силу сдавливания клетки. Кроме того, необходимо параллельно фотографировать сдавленную клетку для измерения площади сдавливания и состояния саркомеров.

Для растяжения кардиомиоцитов выработан ряд адекватных методов, однако несмотря на значительные усилия многих лабораторий, только три названные научные группы достигли определенного успеха. Первый из наиболее употребимых методов — фиксация клетки с двух сторон на двух пипетках, одна из которых является регистрирующей. Увеличение расстояния между пипет-

ками с помощью микроманипулятора приводит, разумеется, к растяжению клетки. Вторая известная методика сводится к тому, что клетку вначале вводят в капилляр, а затем, выдувая ее, раскладывают на две параллельно идущие карбоновые нити, к которым она своими концами и прилипает. Карбоновые нити заранее подсоединены к микроманипуляторам. Затем к центру клетки подводят пипетку и делают patch-clamp в конфигурации whole-cell. Далее при помощи микроманипуляторов можно увеличить расстояние между карбоновыми нитями и, следовательно, растяжение клетки.

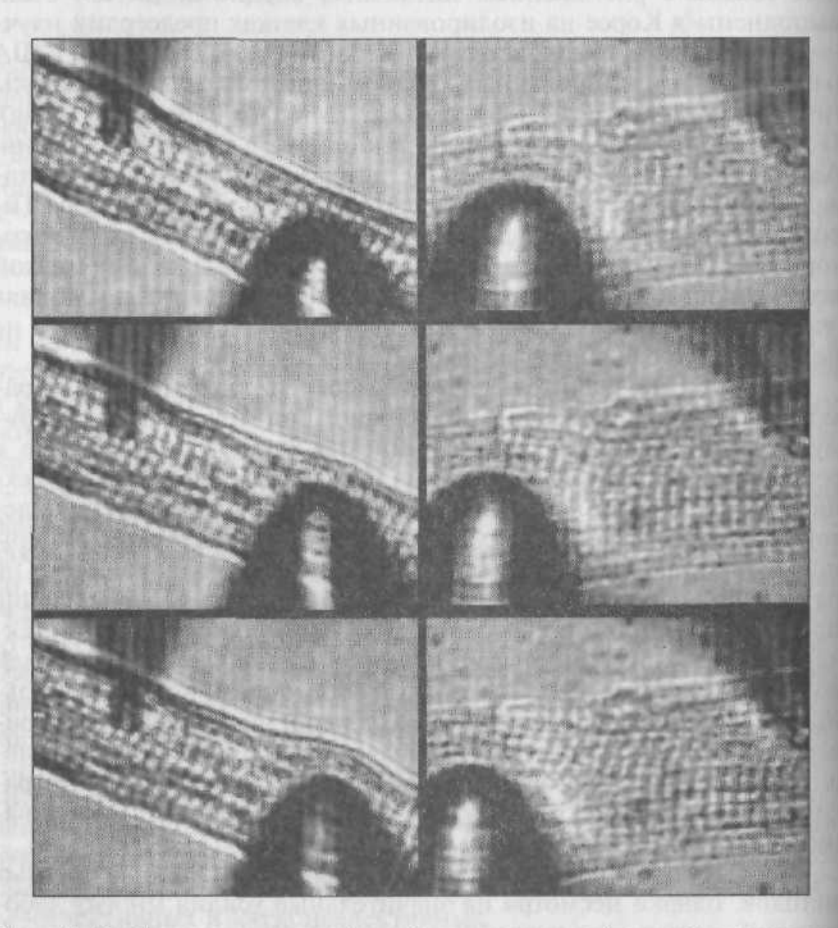
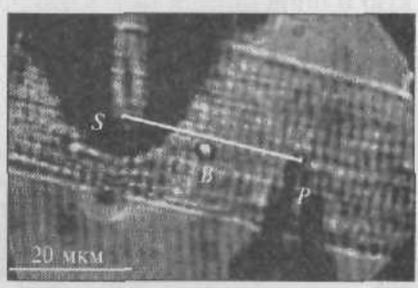


Рис. 11.13. Принцип сжатия (слева) и растяжения (справа) кардиомиоцита (микрофотографии). Степень сжатия или растяжения увеличивается от верхних панелей к нижним. Показаны patch-пипетка и растягивающая пипетка с оплавленным кончиком

Третья методика аналогична предыдущей, но разница заключается в том, что вместо карбоновых нитей используют стеклянные микрокапилляры, покрытые поли-L-лизином. Четвертая методика заключается в том, что сначала один, а затем и второй конец клетки вводят в микрокапилляры, установленные на микроманипуляторах. В этом случае регистрирующую patch-пипетку подводят к центру клетки. При помощи микроманипуляторов возможны увеличение расстояния между капиллярами и, следовательно, растяжение клетки. Пятая методика сводится к тому, что для исследований отбирают клетки, прилипшие одним концом к дну перфузионной камеры. В этом случае регистрирующую пипетку подводят именно к этой части клетки и помимо регистрации выполняют функцию дополнительной фиксации клетки. Другую, слегка оплавленную пипетку подводят к противоположному, не имеющему контакта с дном камеры краю клетки. После касания этой пипеткой клетки в 70 % случаев образуется хороший механический контакт (клетка «приклеивается» к оплавленному кончику этой пипетки). Эта последняя методика, разработанная авторами настоящего издания, является наиболее простой и эффективной.

На рис. 11.13 продемонстрирована возможность локального дозированного сжатия клетки (слева) и растяжения клетки (справа).

Растяжение клетки при помощи растягивающей пипетки с оплавленным кончиком продемонстрировано на рис. 11.14, а на рис. 11.15 представлены микрофотографии растянутого кардиомио-



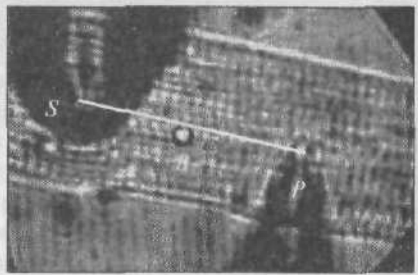


Рис. 11.14. Кардиомиоцит (микрофотографии):

а — нерастянутый; *б* — растянутый. У нерастянутого кардиомиоцита расстояние между растягивающей пипеткой (*S*) и patch-пипеткой (*P*) равно 31 мкм. Расстояние между саркомерами до растяжения равно 1,83 мкм. У растянутого кардиомиоцита зона между *S* и *P* увеличена на 7 мкм. В этом случае расстояние между саркомерами равно 2,09 мкм. Для того чтобы оценить равномерность растяжения, на мембрану клетки нанесена бусинка (*B*). При растяжении клетки расстояние *S*—*B* и *B*—*P* увеличивается равномерно. Фотографии получены иммерсионным объективом (×100)

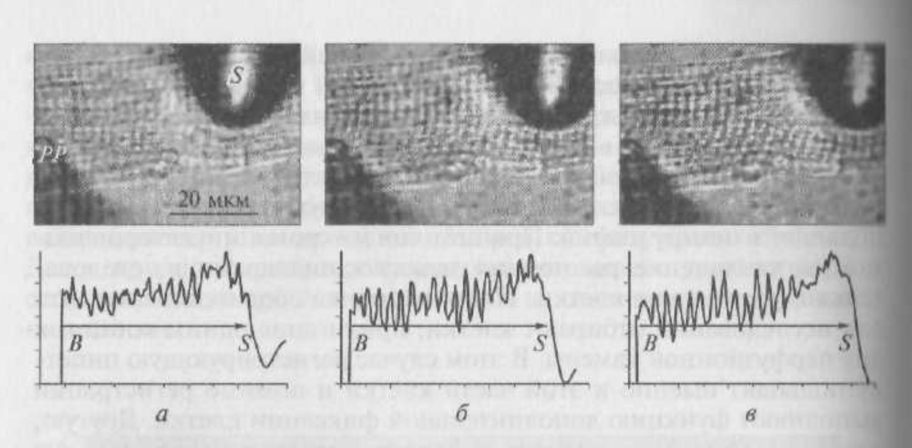


Рис. 11.15. Микрофотографии растяжения кардиомиоцита. Расстояние между растягивающей пипеткой (*S*) и patch-пипеткой (*PP*) возрастает от 38 (*а*) до 42 (*б*) и 46 мкм (*в*). На нижних рисунках показано сканирование саркомерных паттернов. Растяжение между краем (*B*) и растягивающей пипеткой (*S*) увеличивает саркомерное расстояние от 1,8 (*а*) до 1,9 (*б*) и 2,2 мкм (*в*). Фотографии и сканирование получены иммерсионным объективом (× 100)

цита и сканирование саркомерных паттернов, позволяющие точно оценить степень растяжения кардиомиоцита.

В процессе работы с изолированными кардиомиоцитами наблюдали интересное явление. Известно, что изолированные кардиомиоциты напоминают кирпичи и, следовательно, имеют узкую и широкую стороны. По неясным причинам кардиомиоциты прилипают к стеклянному дну перфузионной камеры либо узкой (edgewise position), либо широкой стороной (broad-wise position). Следовательно, под микроскопом кардиомиоцит в ряде случаев может быть виден или в виде узкой и длинной клетки, но это означает лишь то, что он прилип к стеклу узкой стороной или кардиомиоцит может быть виден как широкая клетка, т. е. он прилип к стеклу широкой стороной.

При помощи patch-пипетки мы могли осуществлять поворот кардиомиоцита, лежащего на узкой стороне (рис. 11.16, *а*), на его широкую сторону (рис. 11.16, *г*).

Исследование МСК. Основным методом выявления и исследования единичных МСК клетки является дискретное создание в patch-пипетке отрицательного давления (в миллиметрах ртутного столба) с целью изучения влияния деформации мембраны под действием этого давления на ионный канал. Указанный принцип поведения единичного канала, выявляемого suction, позволяет легко идентифицировать МСК, потому что его физиологический ответ наступает весьма быстро. И сам принцип, и его недостатки были

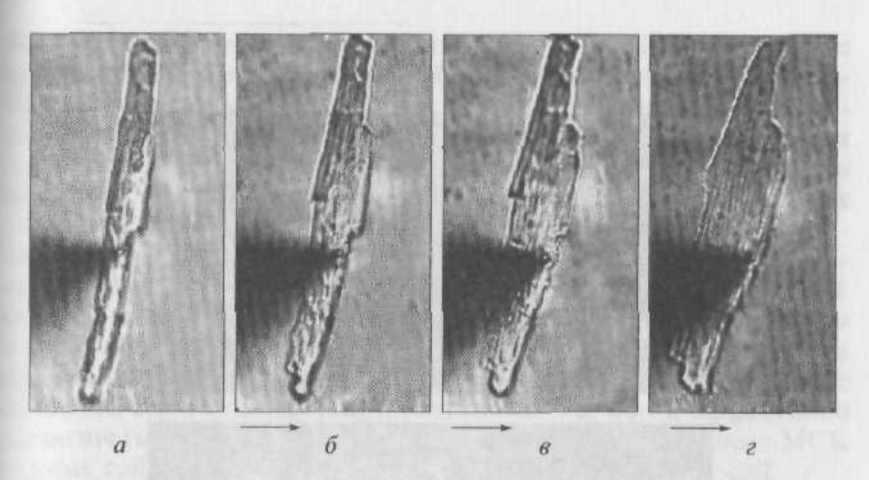


Рис. 11.16. Поворот кардиомиоцита, исходно лежащего на узкой стороне, на его широкую сторону (*а—г*) при помощи patch-пипетки

детально проанализированы ранее, и мы не будем возвращаться к этим вопросам.

Одновременная регистрация МСК и механосенситивных ионных токов при растяжении клетки. До настоящего времени считалось невозможным регистрировать методом cell attached одиночные МСК мембраны любой клетки при ее растяжении, поскольку, с одной стороны, считалось, что мембрана клетки запечатывает patch-пипетку и растяжение клетки не меняет состояния мембра-

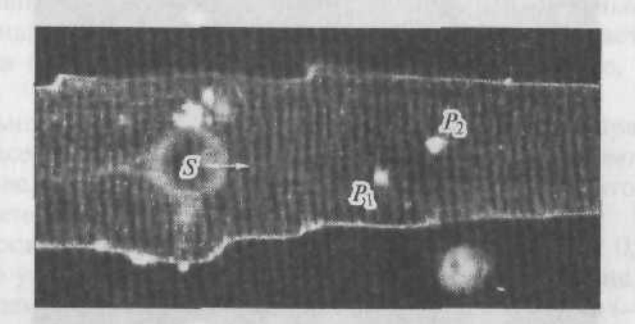


Рис. 11.17. Принцип растяжения кардиомиоцита с использованием одной patch-пипетки, работающей в режиме cell-attached (P_1) и регистрирующей одиночные МСК, и второй patch-пипетки, работающей в режиме whole-cell (P_2), причем через последнюю осуществлялось внутриклеточное введение ВАРТА. Окрашенные кончики обеих пипеток на микрофотографии видны в виде небольших белых пятен. Аксиальное растяжение кардиомиоцита и устранение растяжения (двойная стрелка) осуществляли при помощи оплавленной пипетки (S), кончик которой виден в виде большого серого пятна

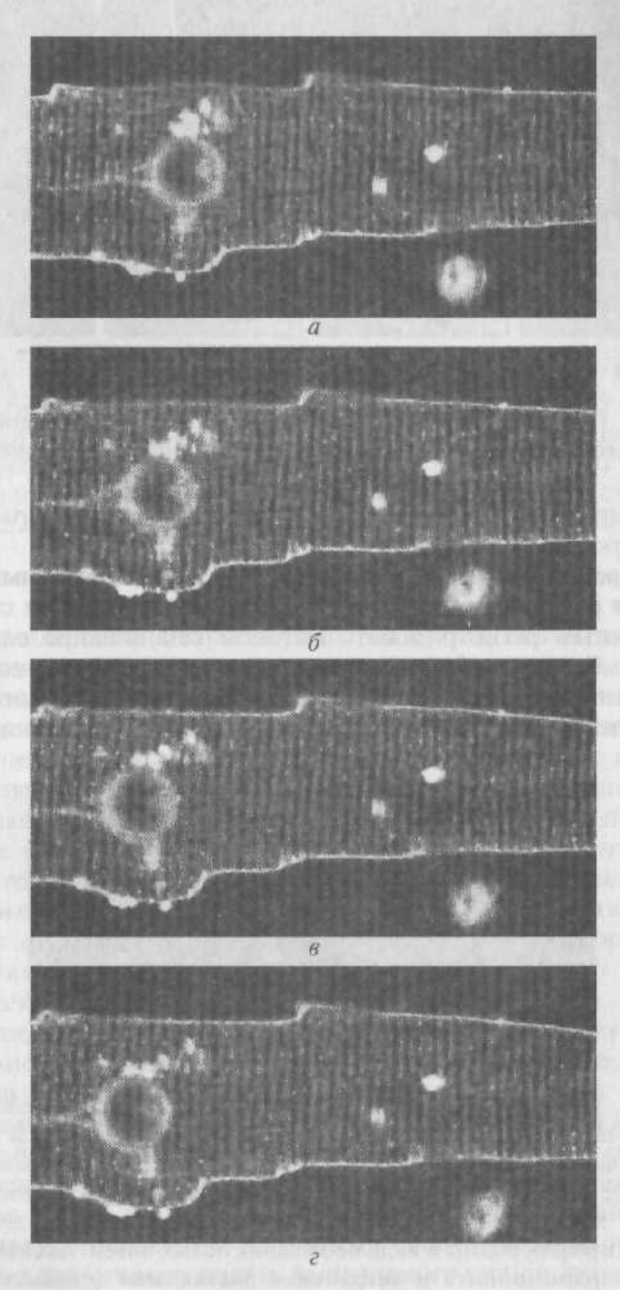


Рис. 11.18. Растяжение кардиомиоцита от контрольного состояния *а* до *г* (микрофотографии)

ны в области отверстия patch-пипетки, а с другой — растяжение клетки приводит к изменению работы внутриклеточных сигнальных систем, прежде всего Ca^{2+} -системы, которая оказывает существенное влияние на изменение работы всех каналов клетки и в том числе каналов под patch-пипеткой. Мы смогли решить эти проблемы, используя одну patch-пипетку, работающую в режиме cell-attached и регистрирующую одиночные МСК, и вторую patch-пипетку, работающую в режиме whole-cell, причем через последнюю осуществлялось внутриклеточное введение BAPTA (рис. 11.17). Окрашенные кончики обеих пипеток на микрофотографии видны в виде небольших белых пятен. Растяжение клетки осуществляли при помощи оплавленной пипетки, кончик которой виден в виде большого серого пятна. Как и ожидалось, мы могли эффективно растягивать клетку (рис. 11.18) и регистрировать одиночные МСК режиме cell attached и суммарные токи в режиме whole-cell.

11.2.2. Исследование механосенситивности кардиомиоцитов предсердий

Исследования кардиомиоцитов в ткани предсердий здоровых животных. При исследовании предсердий фрагмент ткани правого предсердия (4×8 мм), включающего регион синусного узла с пейсмейкерными клетками, крепили между штырем механоэлектрического преобразователя и штырем цифрового микроманипулятора, которым задавали физиологическое предрастяжение (preload) ткани, равное 1 мН. В этих условиях сохранялась стабильная контрактильная активность препарата. Стандартное предрастяжение препарата вызывало стабильную величину active force, равную 0,3 мН.

Детальное исследование влияния растяжения препарата правого предсердия крыс на амплитуду и форму AP кардиомиоцитов было проведено в ряде работ, обсуждаемых ниже, где авторы изучали изменения в APD25, APD50 и APD90.

У здоровых крыс растяжение препарата на (1,75 ± 0,04) мН вызывало укорочение APD50, но увеличение APD90 (рис. 11.19). Рисунок демонстрирует влияние длительного растяжения (~1,7 мН) фрагмента правого предсердия здоровых животных на AP на трех различных уровнях реполяризации: APD25 не изменялась, APD50 была укорочена, в то время как APD90 значительно увеличивалась. Увеличение APD90 было следствием развития stretch-induced depolarization (SID). В противоположность классической ранней или задержанной автодеполяризации, SID, которая увеличивала APD90, не запускалась предыдущим потенциалом действия, а была истинным ответом клетки в результате длительного растяжения миокарда.

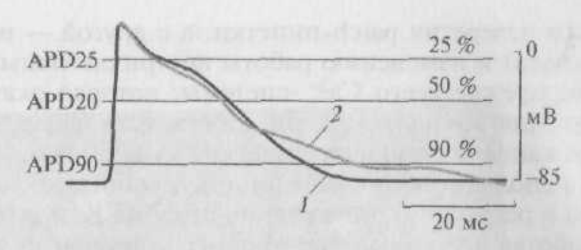


Рис. 11.19. Компьютерное наложение потенциалов действия (AP) кардиомиоцита правого предсердия, полученных на фоне предрастяжения (1 мН) препарата (кривая *1*) и на фоне дальнейшего растяжения препарата на (1,75±0,04) мН (кривая *2*)

Дальнейшее увеличение растяжения до 2 мН вызывало появление дополнительных экстра-AP (рис. 11.20). Экстра-AP возникали исключительно на фоне SID. При этом амплитуда каждого экстрапотенциала была уменьшена, что совершенно типично для любого экстра-AP на фоне деполяризации мембраны. Все эти механически вызванные изменения AP полностью исчезали при снятии растяжения ткани и возвращении величины resting force к исходному уровню. Потенциал покоя, так же как и амплитуда AP не были значительно изменены при растяжении препарата.

Таким образом, на кардиомиоцитах здоровой ткани правого предсердия впрямую при помощи внутриклеточных микроэлектродов была продемонстрирована возможность модуляции электрической активности клеток механическим растяжением ткани.

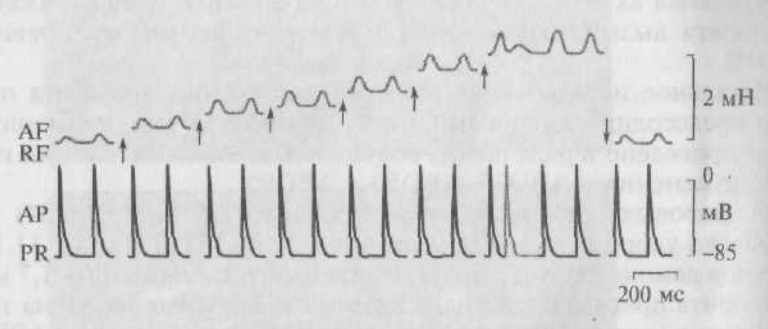


Рис. 11.20. Появление stretch-induced depolarization (SID) и экстрапотенциалов действия (экстра-AP: нижняя кривая) при увеличении силы растяжения препарата правого предсердия здоровой крысы до 2 мН (верхняя кривая). Символ (↑) показывает моменты растяжения препарата, а символ (↓) — момент возвращения величины растяжения препарата к исходному уровню:

AF — active force; RF — resting force; RP — потенциал покоя; AP — потенциал действия

Исследования изолированных кардиомиоцитов предсердий здоровых животных. Эти эксперименты были выполнены на кардиомиоцитах предсердий крысы с использованием нистатинового перфоративного patch в конфигурации whole-cell. Клетки растягивали при помощи двух patch-пипеток (рис. 11.21).

В нормальном растворе Тироде с использованием нистатинового перфоративного patch в режиме current clamp в конфигурации whole-cell потенциал покоя клеток был равен (–63,6±0,58) мВ, а APD90 была равна (108,8±11,9) мс. При растяжении клетки на 20 % двумя patch-пипетками наблюдали деполяризацию мембраны до (–54,6±4,40) мВ. В ряде случаев наблюдали возникновение

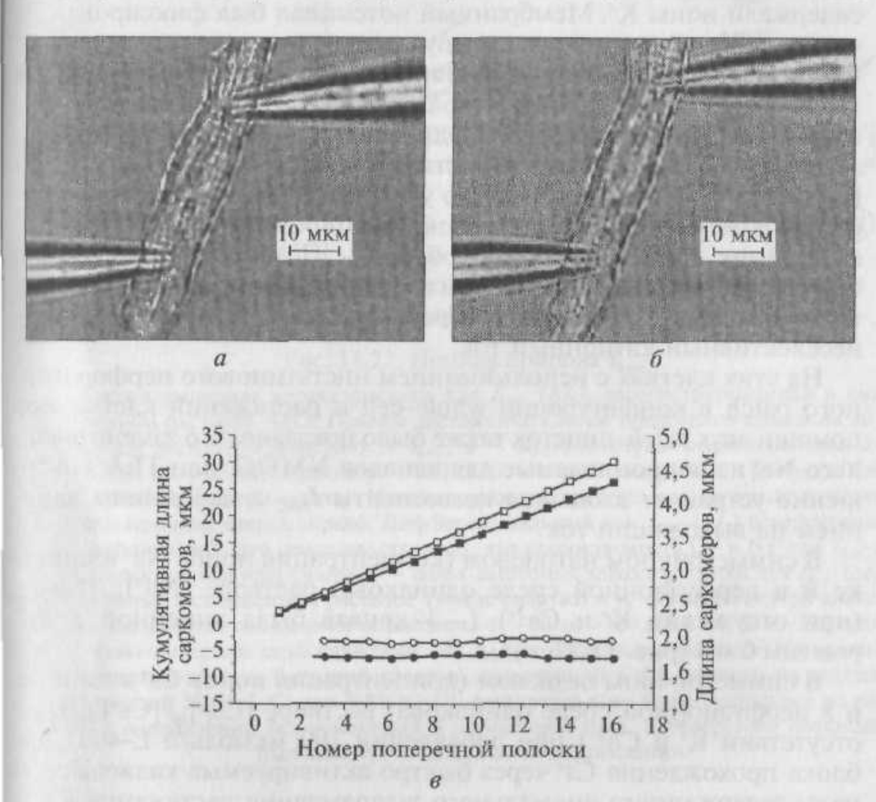


Рис. 11.21. Демонстрация механического растяжения клетки предсердия при помощи двух patch-пипеток:

а — микрофотография, полученная в случае, когда две patch-пипетки были приложены к каждому концу клетки; *б* — микрофотография, полученная в случае, когда верхняя patch-пипетка была перемещена в продольном направлении на 15 % от первоначального расстояния между пипетками; *в* — длина саркомеров, измеренная в виде расстояния между поперечными полосками (кружки; правая ось *y*) и ее совокупные значения (квадраты; левая ось *y*), полученные до (заполненные символы) и после (пустые символы) растяжения

спонтанного экстра-АР. Индуцированные растяжением АР были пролонгированы на уровне ААР90 на (32,2±8,8) мс. Их амплитуда была немного уменьшена. Все эти изменения были реверсивны.

В режиме voltage-clamp с целью проверки гипотезы о том, что I_{SAC} — это неселективный катионный ток, регистрацию тока проводили в условиях измененного ионного состава внеклеточного и пипеточного растворов.

Клетки находились в физиологических условиях, т.е. внеклеточный раствор представлял собой стандартный раствор Тироде, а пипеточный раствор имел полный перечень ионов. Для возможности одновременной регистрации и потенциалов оба раствора содержали ионы K^+. Мембранный потенциал был фиксирован на уровне –30 мВ и смещался импульсным, ступенчатым током от +60 до –120 мВ. В этих условиях регистрировалась стандартная *I*—*V*-кривая аномального выпрямления с током входящего направления, характерная для кардиомиоцитов предсердий при наличии K^+ в обоих растворах. Растяжение клеток при помощи двух patch-пипеток на 20 % вызывало увеличение входящего и выходящего токов. Был рассчитан механоиндуцированный дифференциальный ток, представляющий собой I_{SAC}. Потенциал реверсии его был равен (–6,1±3,7) мВ. Эти изменения были полностью обратимы. Величина потенциала реверсии I_{SAC} демонстрирует, что I_{SAC} — неселективный катионный ток.

На этих клетках с использованием нистатинового перфоративного patch в конфигурации whole-cell и растяжении клетки при помощи двух patch-пипеток также было показано, что замена внешнего Na^+ на непроницаемые для каналов $NMDG^+$ или TEA^+ совершенно устраняет входящие компоненты I_{SAC} с небольшим влиянием на выходящий ток.

В симметричном натриевом (концентрация ионов Na^+ в пипетке и в перфузионной среде одинакова) растворе $[Na^+]_{in}/[Na^+]_{out}$ (при отсутствии K^+ и Ca^{2+}) *I*—*V*-кривая была линейной с E_{rev}, равным 0 мВ (рис. 11.22, *а*)*.

В симметричном цезиевом (концентрация ионов Cs^+ в пипетке и в перфузионной среде одинакова) растворе $[Cs_i^+]_{in}/[Cs^+]_{out}$ (при отсутствии K^+ и Ca^{2+}) при добавлении 100 мкмоль/л Е-4031 для блока прохождения Cs^+ через быстро активируемые калиевые каналы задержанного аномального выпрямления растяжение клетки активировало I_{SAC}.

Чтобы получить коэффициенты сравнительной проницаемости различных катионов через SAC, у кардиомиоцитов предсердий крыс регистрировали I_{SAC} и измеряли реверсный потенциал.

---

* Растяжение клеток на 20 % вызвало увеличение во входящем и выходящем токах (от контрольного до растянутого). Разница между этими токами отражает I_{SAK} (ΔI_S).

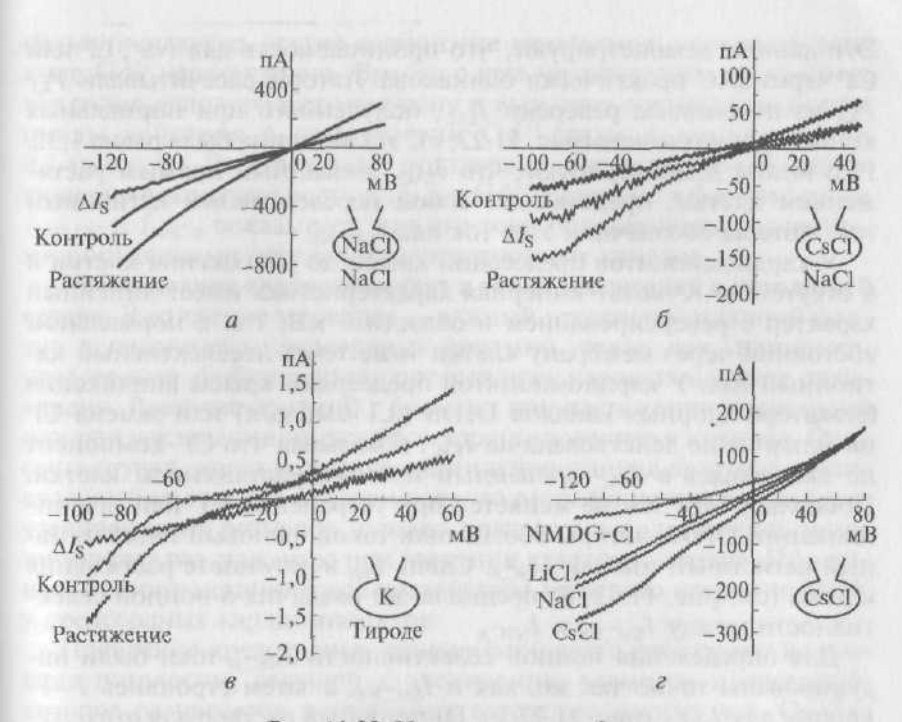


Рис. 11.22. Ионная природа I_{SAC}:

а — вольт-амперная характеристика для I_{SAC} (ΔI_S), зарегистрированная в симметричном растворе NaCl. Прямое растяжение клетки предсердия крысы на 20 % вызывало линейную зависимость I_{SAC}; *б* — вольт-амперная характеристика для I_{SAC} (ΔI_S), полученная в растворе NaCl (140 ммоль/л) снаружи и в растворе CsCl (140 ммоль/л) внутри клетки. Механическое растяжение клетки смещало реверсный потенциал слегка вправо. Дифференциальный ток I_{SAC} (ΔI_S) реверсировался в районе 0 мВ. Это свидетельствовало, что проницаемость Cs^+ и Na^+ для $I_{SAC,NC}$ были практически идентичны; *в* — вольт-амперные характеристики для I_{SAC} (ΔI_S), полученные в стандартном растворе Тироде снаружи и K^+-растворе внутри клетки. Токи вызываются смещением потенциала от +60 до −120 мВ с $dV/dt = -225$ мВ/с; *г* — вольт-амперные характеристики для $I_{NSC,b}$, полученные в растворе 140 ммоль/л CsCl внутри клетки. Внешний раствор, содержащий CsCl, заменен на раствор, содержащий NaCl, LiCl или NMDG-Cl. Амплитуда тока была уменьшена во входящем направлении без изменений в выходящем токе, и реверсный потенциал был сдвинут в негативном направлении

На рис. 11.22, *б* представлены вольт-амперные характеристики клетки в изотоническом растворе $[Cs^+]_{in}/[Na^+]_{out}$. До растяжения E_{rev} был −13 мВ. При растяжении клетки ток возрастал и E_{rev} сдвигался вправо. Вольт-амперная кривая I_{SAC} реверсировала около −2 мВ. В данном случае E_{rev} для I_{SAC} регистрировали и в разных растворах, таких как $[Cs^+]_{in}/[Li^+]_{out}[Na^+]_{in}/[Cs^+]_{out}$, $[Na^+]_{in}/[Li^+]_{out}$, причем полученные реверсные потенциалы значительно не различались. Соотношение $P_{Cs} : P_{Na} : P_{Li}$ было рассчитано как 1,05 : 1,00 : 0,98.

Эти данные демонстрируют, что проницаемость для Na^+, Li^+ или Cs^+ через SAC практически одинакова. Авторы рассчитывали P_K/P_{Na} из потенциала реверсии I_{SAC}, полученного при нормальных концентрациях ионов (рис. 11.22, *в*); эта величина была равна 1,32. Результаты демонстрируют, что I_{SAC}, вызванный прямым растяжением клетки, представляет собой неселективный катионный ток. Авторы обозначили этот ток как $I_{SAC,NS}$.

У кардиомиоцитов предсердий крысы до растяжения клетки и в отсутствие K^+ вольт-амперная характеристика имеет линейный характер с реверсированием в области 0 мВ, т.е. в нормальном состоянии через мембрану клетки тоже течет неселективный катионный ток. У кардиомиоцитов предсердий крысы аппликация блокатора хлорных каналов DIDS (0,1 ммоль/л) или замена Cl^- на аспартат не действовала на I_{SAC}, показывая что Cl^--компонент не вкладывает в I_{SAC} вызванный прямым растяжением клетки. Поскольку этот ток не меняется при устранении Cl^- или при аппликации DIDS, авторы обозначили такой фоновый неселективный катионный ток как $I_{NSC,b}$. Сдвиг E_{rev} в результате растяжения клетки (см. рис. 11.22, *б*) предполагает различия в ионной селективности между $I_{SAC,NS}$ и $I_{NSC,b}$.

Для определения ионной селективности $I_{NSC,b}$-токи были индуцированы точно так же, как и $I_{SAC,NS}$, а затем строились *I—V*-кривые для $I_{NSC,b}$ (рис. 11.22, *г*). Пипеточный раствор для этих экспериментов содержал 140 ммоль/л CsCl. В изотоническом растворе с Cs^+ *I—V*-кривая была линейной с реверсным потенциалом, равным 0 мВ. Замена внешнего Cs^+ на Na^+ или Li^+ уменьшала входящий ток и смещала реверсный потенциал в негативном направлении. Замена на $NMDG^+$ приводила к значительному уменьшению тока. Это свидетельствует о том, что бо́льшую часть входящего тока переносят катионы. Из изменений реверсного потенциала при различных ионных условиях было вычислено отношение проницаемости для $P_{Cs}:P_{Na}:P_{Li}$ как 1,49 : 1,00 : 0,70.

Авторы показали что $I_{NSC,b}$ был выраженно блокирован Gd^{3+} в дозозависимой манере. В то же время $I_{SAC,NS}$ был несомненно несколько активирован в присутствии Gd^{3+} даже в концентрации 0,1 ммоль/л, т.е. этот ток не блокируется Gd^{3+}. Различия влияния Gd^{3+} на $I_{SAC,NC}$ и $I_{NSC,b}$ еще больше проявились в экспериментах с исследованием влияния Gd^{3+} на потенциал действия в условии перфорированного patch-clamp. Добавление 0,1 ммоль/л Gd^{3+} в нормальный внешний раствор Тироде гиперполяризовало мембрану от (−63,6 ± 0,58) до (−71,1 ± 0,26) мВ и заметно укорачивало потенциал действия от (108 ± 11,9) до (28 ± 2,39) мс.

Эти результаты предполагают, что фоновые неселективные катионные каналы (NSC_b) могут влиять на форму потенциала действия посредством генерации входящих токов на фоне потенциала покоя и в течение фазы поздней реполяризации, однако

нельзя исключать другие возможные механизмы, поскольку влияние Gd^{3+} неселективно. Вместе с тем механическое растяжение все равно деполяризует мембрану и вызывает спонтанные потенциалы действия в присутствии Gd^{3+} (даже в концентрации 0,1 ммоль/л). Этот результат подтверждает данные, демонстрирующие нечувствительность $I_{SAC,NC}$ к Gd^{3+}. Различие в фармакологии $I_{SAC,NC}$ и $I_{NSC,b}$ показывает, что эти токи определяются различными популяциями неселективных катионных каналов.

Исследования кардиомиоцитов в ткани предсердий с патологией сердца. Растяжение миокарда — важный предрасполагающий фактор в патогенезе предсердных аритмий, таких как, например, предсердная фибрилляция, предсердная пароксизмальная тахикардия. Развитие аритмий у больных при растяжении предсердий или при увеличении их размеров хорошо известно в клинике. Описаны случаи, когда механически индуцированная аритмия возникала и у больных без патологического растяжения предсердий или увеличения их размеров, однако предсердия подвергались механическому раздражению при введении катетера в сердце. По мнению авторов механическое воздействие вызывало открытие МСК у предсердных кардиомиоцитов.

Появление предсердных тахиаритмий часто наблюдают в условиях патологии, ведущей к увеличению размеров предсердий, которое развивается постепенно, в течение многих лет. Особое внимание нужно уделить изучению роли МСК при заболеваниях, ведущих не к острому растяжению предсердий, а к хронически развивающемуся увеличению их размеров. К таким заболеваниям прежде всего относится инфаркт миокарда, который приводит к структурным, биохимическим и электрофизиологическим изменениям не только в зоне инфаркта, но и в неинфарктных областях миокарда. Эти процессы продолжаются длительное время после острого нарушения коронарного кровотока и носят название ремоделинг.

Хотя гипертрофия после инфаркта миокарда рассматривается как фундаментальный адаптивный ответ сердца, он также может включать и повреждающие эффекты. После инфаркта миокарда наблюдается гипертрофия миокарда. Более того, было показано, что давление в правом предсердии увеличиватся и его величина зависит от величины рубца. Таким образом, помимо изменений, которые наблюдаются в левом желудочке после инфаркта, правое предсердие также вовлекается в процесс ремоделинга, что подтверждают исследования миокарда с помощью электронной микроскопии. Изменения ультраструктуры миокарда касаются митохондрий, которые разбухают и разрушаются, а также разрушения и разбухания саркоплазматического ретикулума, отека и потери ясной структуры и характера миофиламентов. Удлинение потенциала действия — одна из наиболее ярких черт, которые характе-

ризуют гипертрофию миокарда. Помимо этого гипертрофия увеличивает разброс длительности АР, что может быть следствием гетерогенности структурных изменений, которые также видны при электронной микрографии.

Инфаркт любого отдела сердца — это системная патология. Увеличение при инфаркте миокарда пре- и постнагрузки инициирует каскад событий, ведущих в конечном итоге к электрофизиологическим изменениям в разных отделах сердца вследствие механоэлектрической обратной связи. Повышение концентрации внутриклеточного кальция $[Ca^{2+}]_{in}$ — другой путь возникновения аритмии или других патологических процессов при механических воздействиях на миокард в условиях патологии. Изменение $[Ca^{2+}]_{in}$ под влиянием механических факторов (диастолического растяжения или собственно сокращения) вследствие проявления механоэлектрической обратной связи было подтверждено экспериментально. Изменение $[Ca^{2+}]_{in}$ в патологических условиях может обусловить сдвиги мембранного потенциала и развитие аритмии. Уменьшение в этих условиях периодов рефрактерности как проявление механоэлектрической обратной связи может также способствовать развитию аритмии по механизму реентри. Изменения рефрактерности при повышении давления в предсердии наблюдали и у больных.

Известно, что гипертрофированный миокард генерирует аритмии легче, чем нормальная ткань, и в этот процесс, по-видимому, вовлечены МСК. Первые прямые эксперименты с применением микроэлектродной техники убедительно показали наличие механоэлектрической обратной связи в препаратах правого предсердия инфарктных животных.

В этих экспериментах инфаркт миокарда был вызван у крыс перевязыванием левой коронарной артерии. Для экспериментов использовали крыс, имеющих зону инфаркта величиной 16,5 % в левом желудочке. Проявления сердечной гипертрофии, такие как большое содержание коллагена, сморщенные и разрушенные митохондрии, так же как разрушение и разбухание саркоплазматического ретикулума, наблюдались и после инфаркта миокарда.

Величину active force, равную приблизительно 0,3 мН, в двух группах регистрировали при величине предрастяжения препарата (resting force), равной 1 мН. В отсутствие любых изменений в нагрузке не было значительных различий в величине мембранного потенциала и в амплитуде потенциала действия у кардиомиоцитов крыс после инфаркта и у кардиомиоцитов здоровых животных.

Процесс ремоделинга в правом предсердии после инфаркта миокарда левого желудочка приводил к выраженным изменениям в длительности потенциала действия кардиомиоцитов предсердий по сравнению со здоровыми животными (рис. 11.23).

В предсердиях группы животных, которые перенесли инфаркт миокарда, было обнаружено два типа потенциала действия. Первый тип оказался подобным по величине APD25 и APD50 контрольной группы, но был значительно удлинен на уровне APD90. Второй тип показывал значительное увеличение в APD25, APD50 и APD90 по сравнению с контролем (см. рис. 11.23). Эти два типа потенциала действия демонстрировали разные изменения на растяжение в виде SID (рис. 11.24), которая возникала в первом случае на уровне APD90 (AP-SID90), а во втором — на уровне APD50 (AP-SID50).

При этом в случае первого типа AP регистрировали появление экстра-AP на уровне SID в фазу APD90. В случае второго типа SID на фоне APD50 сама не развивалась в экстра-AP, поскольку приходилась на стадию абсолютной рефрактерности. Однако в этом случае SID на фоне APD50 меняла конфигурацию фазы реполяризации и повышала порог на уровне APD90, что приводило к генерации на этом уровне экстра-AP. Эти результаты соответствуют результатам, представленным другими авторами.

Наиболее важные данные связаны с тем, что после инфаркта миокарда SID появляется в обоих зарегистрированных типах потенциала действия, но при значительно меньшей величине растяжения препарата — (0,19±0,02) мН.

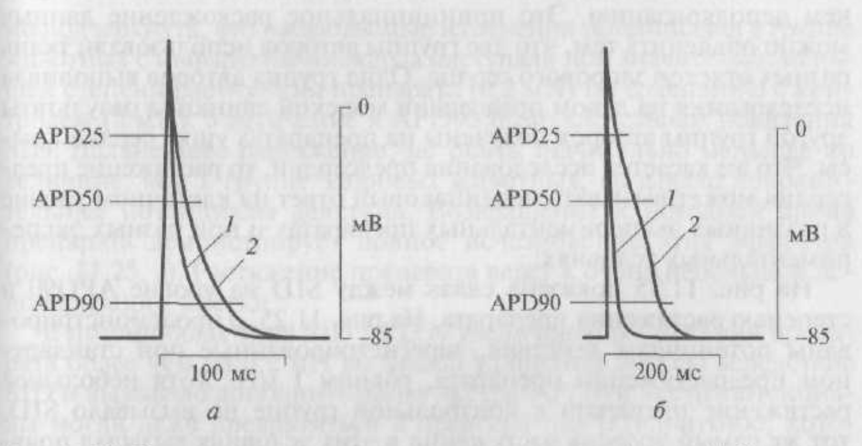


Рис. 11.23. Компьютерное наложение потенциалов действия (AP) кардиомиоцита правого предсердия, полученных на фоне предрастяжения (1 мН) препарата из контрольной группы (*1*) и из группы животных после инфаркта миокарда левого желудочка (*2*). Ремоделинг приводит к появлению двух типов потенциалов действия:

а — первый тип удлиненных потенциалов действия подобен по величине APD25 и APD50 потенциалов действия контрольной группы, но был значительно удлинен на уровне APD90; *б* — второй тип показывает значительное увеличение в APD25, APD50 и APD90 по сравнению с контролем

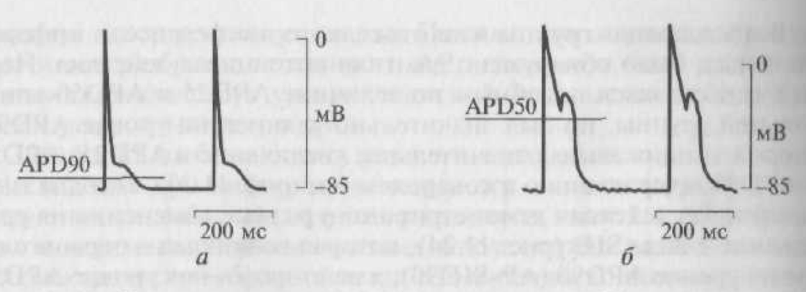


Рис. 11.24. Два типа stretch-induced depolarization (SID), которые возникают у кардиомиоцитов при растяжении ткани предсердия:
а — на уровне APD90; *б* — на уровне APD50

Было показано, что увеличение размеров левого предсердия вызывает уменьшение амплитуды MAP и уменьшение его длительности на уровне MAPD50 при одновременном увеличении длительности на уровне MAPD90 вследствие ранней автодеполяризации. Эти изменения монофазного потенциала могли приводить к аритмиям и экстрасистолам. В противоположность этому в исследованиях других авторов было показано, что растяжение предсердного ушка крыс вызывает скорее задержанную, чем раннюю автодеполяризацию и гиперполяризацию клеток — скорее, чем деполяризацию. Это принципиальное расхождение данных можно объяснить тем, что две группы авторов использовали ткань разных отделов здорового сердца. Одна группа авторов выполняла исследования на левом предсердии морской свинки, а результаты другой группы авторов получены на препаратах ушка сердца крысы. Что же касается исследования предсердий, то растяжение предсердия может вызывать неодинаковый ответ на клеточном уровне в различных экспериментальных препаратах и при разных экспериментальных условиях.

На рис. 11.25 показана связь между SID на уровне APD90 и степенью растяжения препарата. На рис. 11.25, *а* продемонстрированы потенциалы действия, зарегистрированные при стандартном предрастяжении препарата, равном 1 мН. Хотя небольшое растяжение препарата в контрольной группе не вызывало SID, тот же самый уровень растяжения в этих условиях вызывал появление SID (рис. 11.25, *б*). Более того, увеличение растяжения вызывало SID, которая сопровождалась дополнительными потенциалами действия (рис. 11.25, *в*). В этом случае экстра-AP имели бигеминальную форму и уменьшенную амплитуду, как это и ожидается при частично деполяризованной мембране. Растяжение препарата не изменяло APD25, а APD50 была минимально укорочена в каждом эксперименте, в то время как APD90 была увеличена значительно, так же как в группе здоровых животных. Необходи-

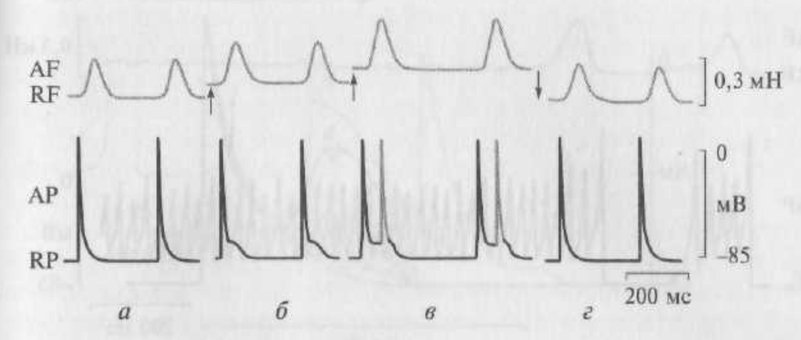


Рис. 11.25. Механоиндуцированная деполяризация на уровне APD90 клетки правого предсердия крысы после инфаркта миокарда левого желудочка: *а* — конторольная регистрация; *б* — небольшая величина растяжения препарата (0,2 мН) ведет к возникновению механоиндуцированной деполяризации; *в* — увеличение растяжения ведет к появлению экстрапотенциалов действия (экстра-AP) на фоне деполяризации; *г* — возвращение к исходному уровню растяжения ткани приводит к возвращению потенциалов к исходному состоянию. Верхняя кривая — регистрация силы сокращения препарата, нижняя кривая — регистрация биоэлектрической активности клетки; символ (↑) показывает моменты растяжения препарата, а символ (↓) — момент возвращения величины растяжения препарата к исходному уровню; AF — active force; RF — resting force; RP — величина потенциала покоя; AP — потенциал действия

мо подчеркнуть, что наблюдаемые изменения потенциалов в группе животных с инфарктом миокарда наступали при значительно меньшей степени растяжения препарата (0,2 мН) по сравнению с контролем (2 мН). Увеличение в APD90 было следствием появления SID. Дальнейшее растяжение, но опять значительно меньшее по величине, чем в группе здоровых животных, вызывало дополнительные потенциалы действия. Возвращение к исходной длине препарата демонстрирует полное исчезновение этих эффектов (рис. 11.25, *г*). Растяжение препарата ведет к очень небольшой деполяризации клетки.

В потенциалах типа SID APD90 увеличение растяжения препарата более чем на 0,2 мН вызывало удлинение APD90 вследствие SID и вызывало дополнительные экстра-AP. Эти экстрапотенциалы могли даже превратиться в предсердную тахиаритмию, которую можно рассматривать как фибрилляцию согласно регистрации механической активности, хотя авторы и не имели электрограммы (рис. 11.26).

Проявление фибрилляции и увеличение чувствительности кардиомиоцитов предсердия к растяжению характерно для препаратов от инфарктных животных.

На рис. 11.27 представлена динамика развития одного экстра-AP в правом предсердии инфарктной крысы при увеличении степени растяжения (*1*—*5*) препарата до 0,2 мН. Второй потенциал воз-

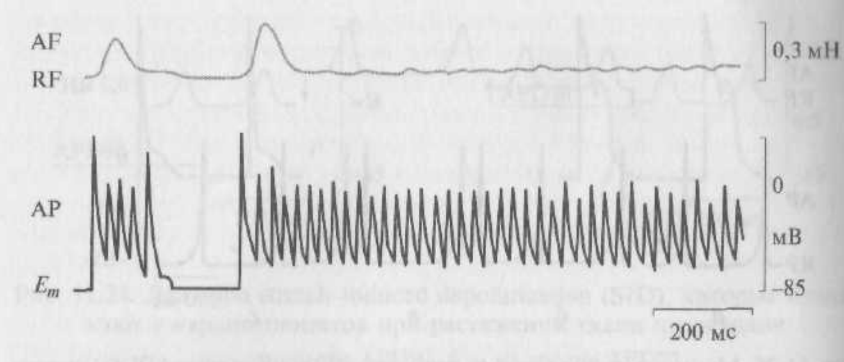


Рис. 11.26. Увеличение растяжения препарата более чем на 0,2 мН вызывало удлинение APD90 вследствие SID и вызывало дополнительные экстрапотенциалы действия (экстра-AP) вплоть до фибрилляции:

верхняя кривая — регистрация силы сокращения препарата; нижняя кривая — регистрация биоэлектрической активности клетки; AF — active force; RF — resting force; E_m — величина мембранного потенциала; AP — потенциал действия

никает при достижении SID критического уровня деполяризации (E_c = –66,6 мВ).

На рис. 11.28 представлена динамика развития двух экстра-AP в правом предсердии крысы, перенесшей инфаркт миокарда левого желудочка, при увеличении степени растяжения (*1—5*) препарата до 0,2 мН. Второй и третий потенциалы возникают при достижении SID критического уровня деполяризации (E_c = –68,0 мВ).

У потенциалов типа APD50 растяжение ткани вызывало SID на уровне APD50 (рис. 11.29). Очень небольшое растяжение, менее (0,19 ± 0,02) мН, увеличило active force и вызывало появление SID на уровне APD50, что значительно увеличило APD50.

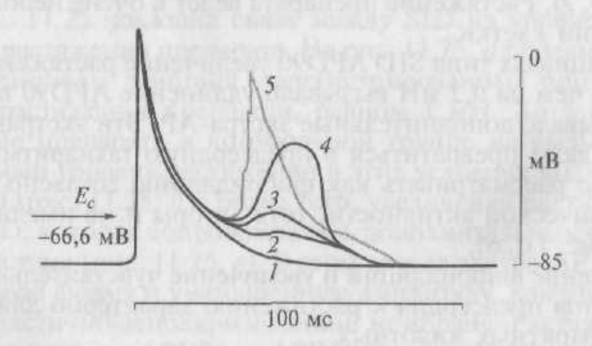


Рис. 11.27. Динамика преобразования SID в потенциал действия (AP) при различных степенях (*1—5*) растяжения препарата в диапазоне от предрастяжения до 0,2 мН; E_c — критический уровень деполяризации

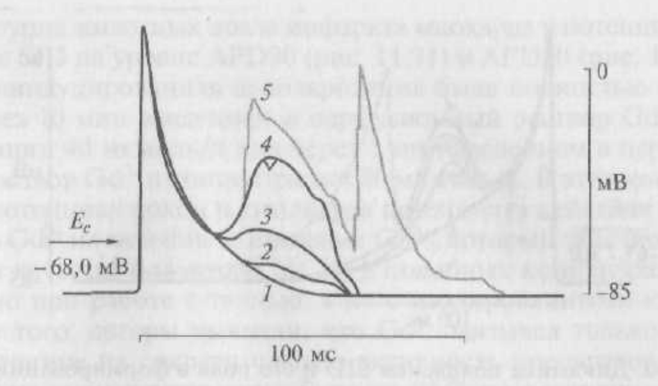


Рис. 11.28. Динамика преобразования SID в потенциалы действия (AP) при различных степенях (*1*—*5*) растяжения препарата в диапазоне от предрастяжения до 0,2 мН; E_c — критический уровень деполяризации

На рис. 11.30 представлена динамика развития одного экстра-AP кардиомиоцита правого предсердия крысы, перенесшей инфаркт миокарда левого желудочка, при увеличении степени растяжения (*1*—*4*) препарата до 0,2 мН. Второй потенциал возникает после окончания периода абсолютной рефрактерности клетки при дос-

Рис. 11.29. Механоиндуцированная деполяризация клетки на уровне APD50 у животного, перенесшего инфаркт. Небольшая величина растяжения препарата (0,2 мН) ведет к возникновению механоиндуцированной деполяризации. Увеличение растяжения не приводит к появлению экстрапотенциалов действия (экстра-AP) на фоне деполяризации. Снятие растяжения возвращает форму потенциала действия (AP) к исходной. Верхняя кривая — регистрация силы сокращения препарата, нижняя кривая — регистрация биоэлектрической активности клетки:

символ (↑) показывает моменты растяжения препарата; символ (↓) — момент возвращения величины растяжения препарата к исходному уровню; AF — active force; RF — resting force; RP — величина мембранного потенциала; AP — потенциал действия

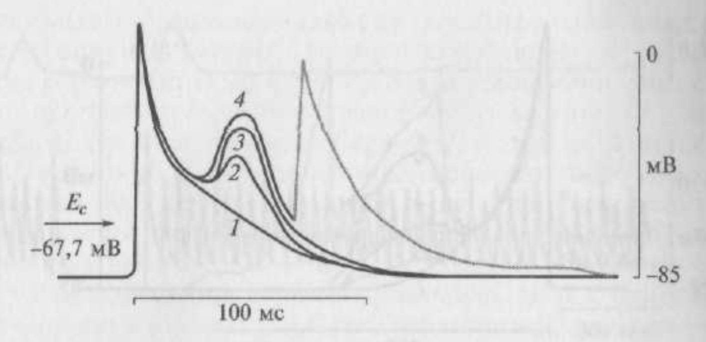


Рис. 11.30. Динамика появления SID и его роль в формировании потенциала действия (AP) при различных степенях (*1*—*4*) растяжения препарата в диапазоне от предрастяжения до 0,2 мН; E_c — критический уровень деполяризации

тижении в этот период SID критического уровня деполяризации ($E_c = -67{,}7$ мВ).

Введение 40 мкмоль/л Gd^{3+} полностью устраняло развитие SID в обоих типах потенциала действия (AP-SID90 и AP-SID50). Гадолиний оказывал только небольшое влияние на сократительную активность препаратов. Регистрировали уменьшение active force до 95 % по сравнению с контролем, но, что особенно важно, влияние Gd^{3+} на механическую активность препарата начиналось после подавления SID.

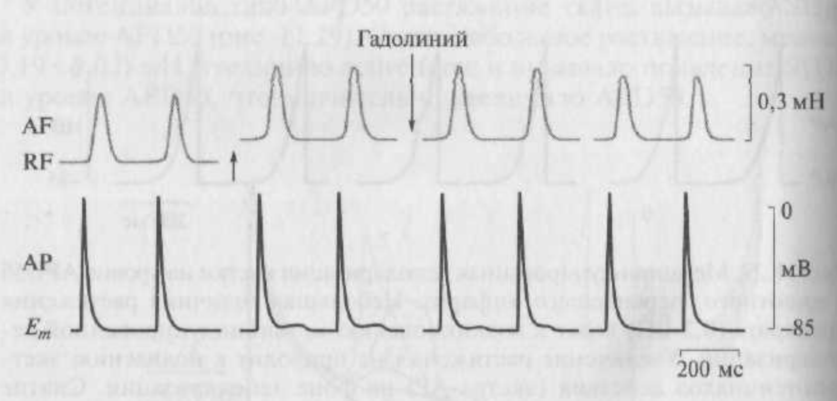


Рис. 11.31. Ингибирование гадолинием, добавленным в перфузионный раствор в концентрации 40 мкмоль/л, SID на уровне APD90:

верхняя кривая — регистрация силы сокращения препарата, нижняя кривая — регистрация биоэлектрической активности клетки; символ (↑) показывает момент растяжения препарата; символ (↓) — момент введения Gd^{3+}; AF — active force; RF — resting force; E_m — величина мембранного потенциала; AP — потенциал действия

В группе животных после инфаркта миокарда у потенциала действия с SID на уровне APD90 (рис. 11.31) и APD50 (рис. 11.32) эта механоиндуцированная деполяризация была полностью подавлена через 10 мин введением в перфузионный раствор Gd^{3+} в концентрации 40 мкмоль/л или через 5 мин введением в перфузионный раствор Gd^{3+} в концентрации 80 мкмоль/л. В этих концентрациях потенциал покоя и амплитуда потенциала действия под влиянием Gd^{3+} не менялись. Введение Gd^{3+}, который обычно используют в качестве блокатора МСК, в подобных концентрациях оправдано при работе с тканью, а не с изолированными клетками. Кроме того, авторы выявили, что Gd^{3+} оказывал только небольшое влияние на сократительную активность препаратов. Регистрировали уменьшение active force до 95 % по сравнению с контролем, но, что особенно важно, влияние Gd^{3+} на механическую активность препарата начиналось после подавления SID.

Развитие SID в группе животных с инфарктом миокарда на двух уровнях реполяризации потенциала действия еще недостаточно ясно. В случаях потенциала действия с удлинением на уровне APD90 SID возникала вследствие долго длящегося растяжения. Это могло зависеть от увеличения преднагрузки вследствие растяжения, которое вело к SID. В случаях потенциала действия с удлинением на уровне APD50 эта фаза могла быть замаскирована. Вследствие того что SID на уровне APD50 и коротко длящийся пик изометрического сокращения протекали одновременно, механозависимое увеличение active force могло быть дополнительным,

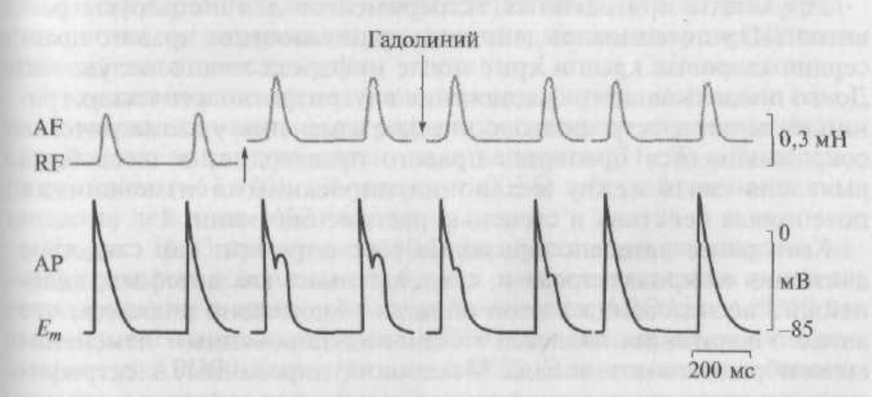


Рис. 11.32. Ингибирование гадолинием, добавленным в перфузионный раствор в концентрации 40 мкмоль/л, SID на уровне APD50:

верхняя кривая — регистрация силы сокращения препарата; нижняя кривая — регистрация биоэлектрической активности клетки; символ (↑) показывает моменты растяжения препарата; символ (↓) — момент введения Gd^{3+}; AF — active force; RF — resting force; E_m — величина мембранного потенциала; AP — потенциал действия

коротко длящимся эффективным механическим стимулом, вызывающим эту особую SID.

При инфаркте повышается чувствительность мембранного потенциала сердечных кардиомиоцитов к растяжению ткани, и, по-видимому, это является причиной их предрасположенности к развитию предсердной аритмии. Механоиндуцированные экстрасистолы и фибрилляция ассоциируются с SID, которая появляется на уровне APD90. Длительное или хроническое растяжение ткани может не прямо запускать аритмию, а вызывать электрофизиологические изменения, которые способствуют развитию аритмий, однако механизм, лежащий в основе этих аритмий, нуждается в последующих исследованиях.

Появляющаяся на уровне APD90 SID соответствует поздней фазе реполяризации, при которой инактивация потенциалуправляемых Na^+-каналов уже исчезла. Сравнительно большие различия между мембранным потенциалом, принадлежащим APD90 и равновесным потенциалом для механосенситивных токов, могут способствовать генерации развития эффективной движущей силы для токов, входящих через МСК, и соответственно способствовать развитию SID. На уровне APD90 SID может деполяризовать мембрану до уровня порога вследствие активации быстрых Na^+-токов и приводить к генерации дополнительных потенциалов действия.

Развивающаяся на уровне APD50 SID появляется в течение рефрактерного периода потенциала действия и приводит к появлению экстра-АР позднее.

Результаты приведенных экспериментов демонстрируют развитие SID у потенциалов действия кардиомиоцитов правого предсердия здоровых крыс и крыс после инфаркта левого желудочка. Долго продолжающееся растяжение внутри физиологических границ вызывает электрофизиологические изменения у изометрически сокращающегося препарата правого предсердия, и здесь была выявлена связь между механоиндуцированными изменениями потенциала действия и степенью растяжения ткани.

Хотя ранее автодеполяризацию рассматривали как следствие движения микроэлектрода и, следовательно, как артефакт, дальнейшие исследования в этой области убедительно доказали, что автодеполяризация является механоиндуцированным изменением мембранного потенциала. Механоиндуцированные электрофизиологические изменения формы потенциалов действия рассматриваются как компонент механоэлектрической обратной связи в сердце и определяются, по-видимому, работой МСК.

Существование МСК в сердечных клетках было показано экспериментально или постулировалось на основании косвенных экспериментов. Существование МСК было показано и для кардиомиоцитов предсердий. Потенциал реверсии механосенситивных

токов в этих клетках лежит в пределах от –15 до –18 мВ. В других исследованиях было установлено, что реверсный потенциал обусловлен главным образом Na^+-, K^+-, Ca^{2+}-токами и лежит в пределах –40 мВ. Миокардиальные МСК могут пропускать как входящие, так и выходящие токи. При физиологических условиях растяжение, которое приложено в течение плато потенциала действия, при котором мембранный потенциал более позитивный, чем реверсный, будет реполяризовать мембрану и укорачивать длительность потенциала действия благодаря входу катионов. Если мембранный потенциал более отрицательный, чем реверсный, растяжение будет вызывать выходящие токи, которые будут менять потенциал действия, соответственно вызывая SID.

Вероятно, длительное растяжение препарата в этих экспериментах активирует Gd^{3+}-чувствительные входящие токи через МСК, которые вызывают или обусловливают наблюдаемую деполяризацию. Увеличение постинфарктной механической чувствительности приводит к генерации дополнительных потенциалов действия или аритмии. Это происходит вследствие того, что SID достигает порогового потенциала, особенно в случаях сравнительно коротких потенциалов действия предсердных кардиомиоцитов. Эти электрофизиологические изменения потенциалов чувствительны к Gd^{3+}, что поддерживает точку зрения о включении МСК. Однако, как было сообщено в литературе, Gd^{3+} также блокирует L-тип Ca^{2+}-каналов в изолированных кардиомиоцитах морских свинок. В то же время было показано, что Gd^{3+} блокирует механоиндуцированные аритмии у изолированных препаратов миокарда кролика. Таким образом, кажется менее вероятным, что во всех представленных экспериментах подавление механоиндуцированных аритмий является следствием угнетения L-типа Ca^{2+}-каналов.

У кардиомиоцитов предсердий гипертрофированной ткани сердца человека основные электрофизиологические параметры были следующие: амплитуда потенциала действия (71±8) мВ, потенциал покоя (–63±10) мВ, овершут (8±6) мВ, длительность потенциала действия (452±65) мс.

На рис. 11.33 представлен эффект длительного растяжения на конфигурацию потенциала действия на трех различных уровнях реполяризации в атриальной ткани человека: APD25 и APD50 не были изменены, в то время как APD90 был сильно увеличен. Увеличение в APD90 было связано с SID. Длительное растяжение увеличило развитие active force. В предсердной ткани человека изометрическая пиковая сила увеличивалась от (1,9±0,3) (кривая *1*) до (2,1±0,2) мН (кривая *2*). Эти эффекты были полностью обратимы после устранения растяжения. Величина потенциала покоя и амплитуда потенциала действия не менялись при растяжении ткани. При APD90 SID были полностью подавлены после аппликации 40 мкмоль/л Gd^{3+} в течение 10 мин. Эти эксперименты с

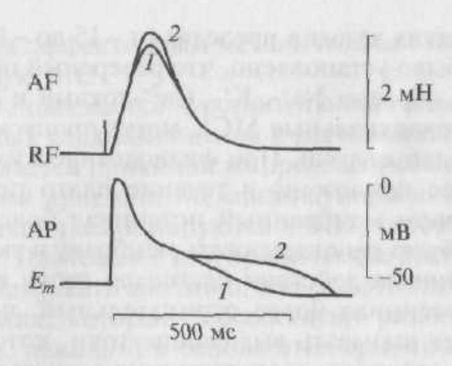


Рис. 11.33. Одновременная регистрация изометрического развития силы — resting force (RF), active force (AF) предсердной трабекулы сердца человека (верхняя кривая) и потенциал действия (AP) кардиомиоцита (нижняя кривая). Наложение потенциалов действия при preload, равном 1 мН (кривая *1*), и амплитуды active force (AF), равной 1,9 мН, в течение увеличения амплитуды изометрической силы (AF) до 2,1 мН при растяжении ткани. Обратите внимание, что механическое растяжение вызывает SID (кривая *2*) около APD90 по сравнению с контролем

Gd^{3+}, который блокировал изменения электрофизиологических параметров, вызванных растяжением, предполагают участие МСК.

Исследования изолированных кардиомиоцитов предсердий с патологией сердца. В режиме current clamp, когда клетки были стимулированы импульсами электрического тока частотой 1 Гц величиной 100 пА и длительностью 10 мс, предсердные кардиомиоциты человека отвечали на растяжение деполяризацией мембранного потенциала, и увеличение растяжения на 2 мкм (S1 на рис. 11.34, *а*) или 3 мкм (S2 на рис. 11.34, *а*) индуцировали появление SID в пределах длительности потенциала действия на уровне 90 % фазы реполяризации (APD90). Дополнительные потенциалы действия наблюдались после растяжения предсердных кардиомиоцитов человека на 4 (S3 на рис. 11.34, *б*) или 6 мкм (S4 на рис. 11.34, *б*).

Тестовые импульсы смещали потенциал относительно поддерживаемого потенциала, установленного на уровне −45 мВ для инактивации TTX-сенситивного Na^+-тока. Замена K^+ на Cs^+ в перфузионном растворе и patch-пипетке привела к подавлению K^+-каналов аномального выпрямления с током входящего направления (I_{K1}), что позволило разделить токи на компоненты в общей композиции токов. L-тип Ca^{2+}-тока ($I_{Ca\text{-}L}$) и поздний ток (I_L), измеренный в конце деполяризующего импульса длительностью 140 мс (рис. 11.35, *а*), были зарегистрированы у предсердного кардиомиоцита человека с использованием конфигурации whole-cell при применении метода patch-clamp на фоне ингибирования K^+-каналов

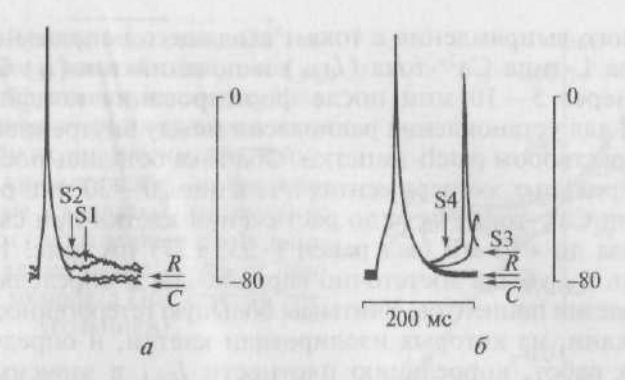


Рис. 11.34. Мембранная деполяризация, пролонгирование потенциала действия и дополнительные потенциалы действия в ответ на механическое растяжение кардиомиоцита предсердий человека с гипертрофией миокарда. Кардиомиоциты были растянуты от исходной величины (*C*) на 2 (S1), 3 (S2), 4 (S3) или 6 мкм (S4):

а — растяжение на 2 или 3 мкм деполяризовало мембрану и пролонгировало длительность потенциала действия на уровне 90 % реполяризации (APD90). Расслабление мембраны (*R*) полностью устраняло вызванную растяжением деполяризацию мембраны; *б* — увеличение растяжения до 4 или 6 мкм увеличило амплитуду механоиндуцированной деполяризации на уровне APD90 и вызывало дополнительные потенциалы действия, когда достигался пороговый уровень

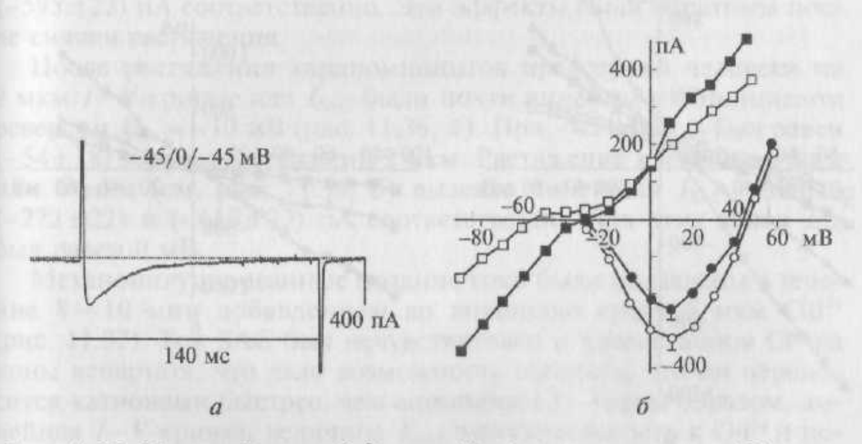


Рис. 11.35. Пример L-типа Ca^{2+}-тока ($I_{Ca\text{-}L}$) и позднего тока (I_L), измеренного в конце деполяризующего импульса длительностью 140 мс у предсердного кардиомиоцита человека на фоне ингибирования K^+-тока (I_{K1}):

а — оригинальная регистрация тока в конфигурации whole-cell. Деполяризующие импульсы длительностью 140 мс были использованы от поддерживаемого потенциала величиной –45 мВ; *б* — вольт-амперные кривые токов, измеренных в конце импульса: I_L (квадраты) до (пустые) и после (заполненные) растяжения клетки; пиковый $I_{Ca\text{-}L}$ (кружки) до (пустые) и после растяжения клетки (заполненные)

аномального выпрямления с током входящего направления (I_{K1}). Амплитуда L-типа Ca^{2+}-тока ($I_{Ca\text{-}L}$) и поздний ток (I_L) были измерены через 5—10 мин после формирования конфигурации whole-cell для установления равновесия между внутренней средой клетки и раствором patch-пипетки. Оба тока остались постоянными в контрольных экспериментах в течение 20—30 мин регистрации. L-тип Ca^{2+}-тока ($I_{Ca\text{-}L}$) до растяжения клетки при смещении потенциала до +10 мВ был равен (–255 ± 77) пА (рис. 11.35, *б*). Плотность $I_{Ca\text{-}L}$ была достаточно вариабельна и определялась историей болезни пациентов. Учитывая большую гетерогенность фрагментов ткани, из которых изолировали клетки, и определенную цель этих работ, корреляцию плотности $I_{Ca\text{-}L}$ в зависимости от диагноза, лечения, пола, возраста и данных о пациенте, как это делали другие авторы, не проводили. Типичные *I—V*-кривые для $I_{Ca\text{-}L}$ и I_L до и после растяжения клетки показаны на рис. 11.35, *б*. Поэтому ток I_L был равен (+16 ± 9) пА при –45 мВ. Механическое растяжение клетки на 2 мкм уменьшало $I_{Ca\text{-}L}$, и этот эффект был максимальным при +10 мВ. В среднем растяжение клетки на 2 мкм уменьшило $I_{Ca\text{-}L}$ от (–255 ± 77) до (–181 ± 56) пА при потенциале +10 мВ (см. рис. 11.35, *б*).

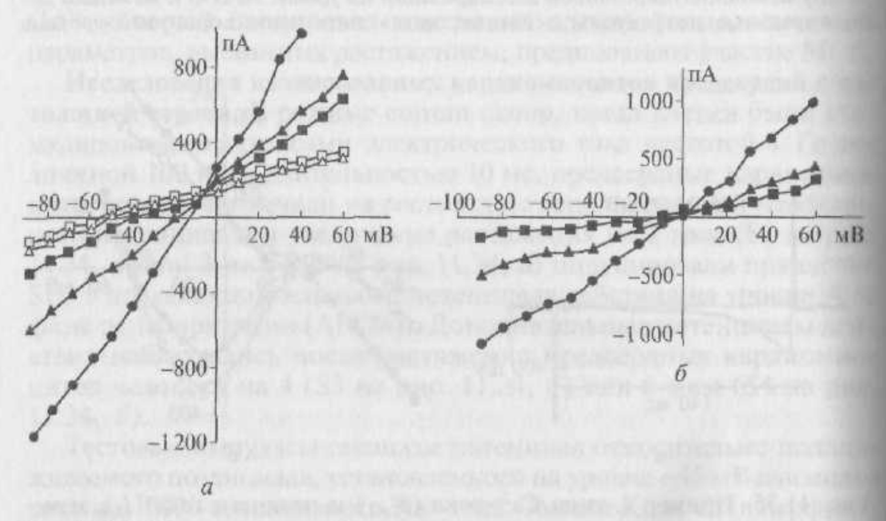
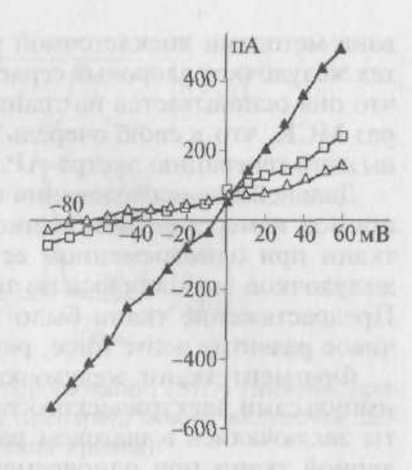


Рис. 11.36. Модуляция мембранных токов растяжением на фоне подавления калиевых токов:

а — вольт-амперные кривые для I_L, измеренного в конце деполяризующего импульса длительностью 140 мс (пустые квадраты — до растяжения; пустые треугольники — после устранения растяжения; заполненные квадраты — растяжение равно 2 мкм; заполненные треугольники — растяжение равно 4 мкм; заполненные круги — растяжение равно 6 мкм); *б* — вольт-амперные кривые и потенциал реверсии (E_{rev}) тока I_{SAC} при растяжении на 2 (квадраты), 4 (треугольники) и 6 мкм (круги)

Рис. 11.37. Чувствительность к Gd^{3+} активированных растяжением токов на фоне ингибирования калиевого тока. Индуцированные растяжением клетки I_L и I_{SAC} были построены как вольт-амперные кривые: для I_L до растяжения (пустые квадраты), растяжение равно 4 мкм (заполненные треугольники), растяжение равно 4 мкм в присутствии 5 мкмоль/л Gd^{3+} (пустые треугольники)



Пример, показанный на рис. 11.36, *а*, иллюстрирует зависимость тока от потенциала (*I*—*V*-кривые) поздних токов до и на фоне механического растяжения клетки. Токи, вызванные механическим растяжением клетки, увеличиваются с нарастанием величины растяжения. Увеличение растяжения при поддерживаемом потенциале, равном −45 мВ, на 2, 4 или 6 мкм вызывало механоиндуцированные поздние токи, равные (−38 ± 6), (−254 ± 17) и (−595 ± 22) пА соответственно. Эти эффекты были обратимы после снятия растяжения.

После растяжения кардиомиоцитов предсердий человека на 2 мкм *I*—*V*-кривые для I_{SAC} были почти линейны с потенциалом реверсии E_{rev} = −10 мВ (рис. 11.36, *б*). При −45 мВ I_{SAC} был равен (−54 ± 18) пА при растяжении 2 мкм. Растяжение клеток на 4 мкм или 6 мкм (см. рис. 11.36, *б*) вызвало линейный I_{SAC}, равный (−272 ± 22) и (−613 ± 22) пА соответственно. Для этих токов E_{rev} был равен 0 мВ.

Механоиндуцированные поздние токи были подавлены в течение 8—10 мин добавлением во внешнюю среду 5 мкм Gd^{3+} (рис. 11.37). Ток SAC был нечувствителен к замене ионов Cl^- на ионы аспартата, что дало возможность полагать, что он переносится катионами быстрее, чем анионами Cl^-. Таким образом, линейная *I*—*V*-кривая, величина E_{rev}, чувствительность к Gd^{3+} и нечувствительность к анионам Cl^- свидетельствуют о том, что I_{SAC} течет через механосенситивные, катионнеселективные каналы.

11.2.3. Исследование механосенситивности кардиомиоцитов желудочков

Исследования кардиомиоцитов в ткани желудочков здоровых животных. Механоэлектрическая обратная связь продемонстриро-

вана методами внеклеточной регистрации в различных препаратах желудочков здоровых сердец; было высказано предположение, что она основывается на трансмембранных потоках катионов через МСК, что в свою очередь может смещать потенциал покоя и вызвать генерацию экстра-АР.

Дальнейшие исследования в этой области были направлены на прямое измерение мембранного потенциала кардиомиоцитов в ткани при одновременном ее растяжении. Исследование ткани желудочков выполнялось по той же схеме, как и для предсердий. Предрастяжение ткани было таковым, чтобы обеспечить устойчивое развитие active force, равной 0,5 мН.

Фрагмент ткани желудочка стимулировали прямоугольными импульсами электрического тока с частотой 0,5 Гц. Эксперименты заключались в шаговом растяжении и релаксации вентрикулярной ткани при одновременной регистрации микроэлектродной техникой биоэлектрических параметров клеток.

Примеры потенциалов действия, зарегистрированные на фоне предрастяжения препарата от вентрикулярной ткани контрольных животных, изображены на рис. 11.38. Величина предрастяжения была такой, чтобы получить active force — 0,5 мН. Было показано, что в течение экспериментального протокола в отсутствие любых изменений в предрастяжении форма потенциала действия остается устойчивой.

В контрольной группе растяжение более чем 150 мкм увеличивает active force от 0,48 до 0,88 мН. Эти эффекты полностью обратимы после снятия растяжения. В экспериментах показано, что потенциал покоя клетки, так же как и амплитуда потенциала действия, не зависят от величины растяжения.

На рис. 11.39 показан типичный эффект длительного растяжения препарата левого желудочка у контрольных животных, веду-

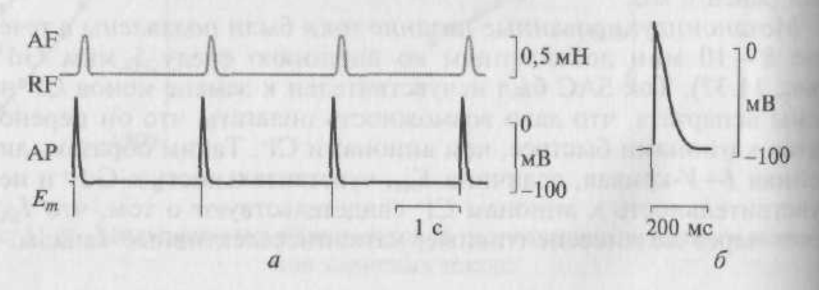


Рис. 11.38. Длительная регистрация силы сокращений препарата (AF) левого желудочка и потенциалов действия (АР) от этого препарата у здоровых крыс:

а — верхняя кривая — регистрация силы сокращения препарата; нижняя кривая — регистрация биоэлектрической активности клетки; *б* — одиночный потенциал действия (АР) кардиомиоцита здорового животного

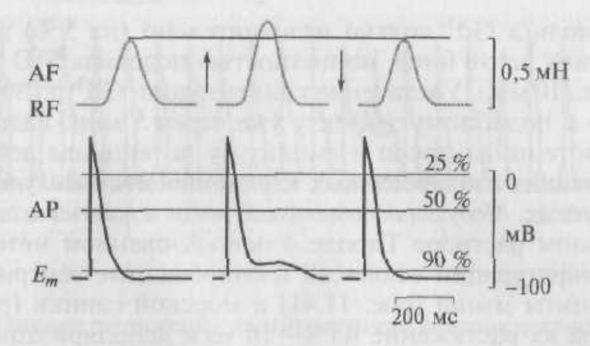


Рис. 11.39. Появление stretch-induced depolarization (SID) (нижняя кривая) при увеличении силы растяжения препарата левого желудочка здоровой крысы (верхняя кривая):

символ (↑) показывает моменты растяжения препарата; символ (↓) — момент возвращения величины растяжения препарата к исходному уровню; AF — active force; RF — resting force; E_m — потенциал покоя; AP — потенциал действия

щего к увеличению active force. При этом APD25 и APD50 остались постоянными в течение растяжения, однако APD90 был существенно увеличен. Увеличение APD90 было связано с появлением SID. Малое растяжение вело к малой амплитуде SID. Дальнейшее увеличение растяжения приводило к увеличению амплитуды SID.

На рис. 11.40 показаны эффекты увеличения active force в результате шагового увеличения степени растяжения препарата, которое пролонгирует APD90, из-за появления и дальнейшего увеличения SID у клеток контрольной группы животных. Перфу-

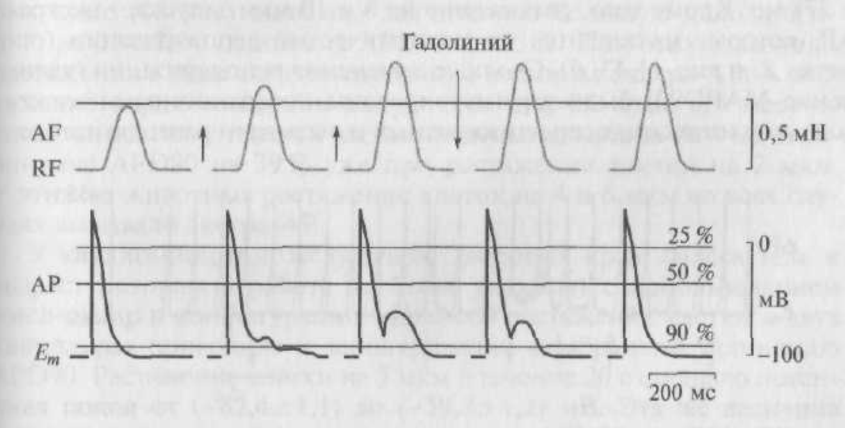


Рис. 11.40. Ингибирование гадолинием, добавленным в перфузионный раствор в концентрации 40 мкмоль/л; SID на уровне APD90:

символ (↑) показывает моменты растяжения препарата; символ (↓) — момент введения Gd^{3+}; AF — active force; RF — resting force; E_m — величина мембранного потенциала; AP — потенциал действия

зия 40 мкмоль/л Gd^{3+} только незначительно (на 5%) ингибировала величину active force, но полностью подавила SID на уровне APD90 через 10 мин. Увеличение концентрации Gd^{3+} до 80 мкмоль/л приводило к подобному эффекту уже через 5 мин. Гадолиний не влиял на потенциал покоя и амплитуду потенциала действия.

Исследования изолированных кардиомиоцитов желудочков здоровых животных. *Модуляция потенциала покоя и потенциала действия.* В нормальном растворе Тироде с использованием метода patch-clamp в конфигурации whole-cell изолированные вентрикулярные кардиомиоциты мыши (рис. 11.41) и морской свинки (рис. 11.42) отвечают на их растяжение на 8—10 мкм деполяризацией мембраны клетки, увеличением длительности потенциала действия и возникновением экстра-АР. Снятие растяжения полностью возвращает регистрируемые параметры к исходному состоянию.

На рис. 11.43 показано компьютерное совмещение потенциала действия изолированного вентрикулярного кардиомиоцита морской свинки в исходном состоянии и на фоне его растяжения, которое осуществляется в нормальном растворе Тироде с использованием метода patch-clamp в конфигурации whole-cell. Изолированные кардиомиоциты здорового желудочка морской свинки отвечают на растяжение изменением величины потенциала покоя и длительности потенциала действия. Показано, что растяжение на 2 мкм не меняет величину потенциала покоя и форму потенциала действия кардиомиоцитов. Растяжение на 4 мкм деполяризует покоящуюся мембрану на (3 ± 1) мВ (рис. 11.43, *а*), а растяжение на 8 мкм деполяризует на (6 ± 2) мВ (рис. 11.43, *б*).

Растяжение на 8 мкм удлиняет APD90 от (360 ± 14) до (502 ± ± 27) мс. Кроме того, растяжение на 8 и 10 мкм запускает экстра-АР, которые начинаются от диастолической деполяризации (отметка *3* на рис. 11.43, *б*). Сходные изменения реполяризации (удлинение MAPD90) были зарегистрированы поверхностными электродами у интактных сердец животных и вызывали раннюю автоде-

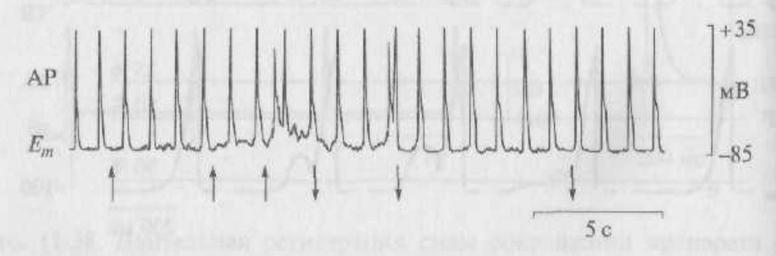


Рис. 11.41. Влияние растяжения изолированного вентрикулярного кардиомиоцита мыши на потенциал покоя и потенциал действия:

символ (↑) — моменты увеличения растяжения клетки, символ (↓)— моменты возвращения к исходному растяжению; АР — потенциал действия; E_m — потенциал покоя

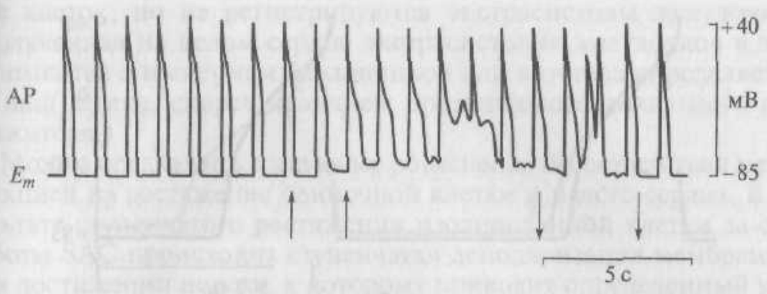


Рис. 11.42. Влияние растяжения изолированного вентрикулярного кардиомиоцита морской свинки на потенциалы покоя и действия:

символ (↑) — моменты увеличения растяжения клетки; символ (↓) — моменты возвращения к исходному растяжению; АР — потенциал действия; E_m — потенциал покоя

поляризацию и аритмию у человека. Аналогичные данные были получены и микроэлектродами у фрагментов ткани здорового сердца.

В нормальном растворе Тироде с использованием patch-clamp в конфигурации whole-cell растяжение изолированных кардиомиоцитов желудочков молодых крыс (3 мес) на 2 и 4 мкм не приводило к появлению деполяризации и изменению длительности потенциала действия. При дальнейшем увеличении степени растяжения клетки деполяризация мембраны и удлинение потенциала действия на уровне APD90 регистрировали у всех исследованных клеток. Так, растяжение кардиомиоцита на 8 мкм вызывало деполяризацию на 6 мВ и удлинение APD90 на 32 %. Аналогичное растяжение на 8 мкм кардиомиоцитов желудочков здоровых старых крыс (15 мес) вызывает значительно бо́льшую деполяризацию на 11 мВ и удлинение APD90 на 43 %. При этих величинах растяжения в ряде случаев спонтанно возникал экстра-АР. А растяжение кардиомиоцитов желудочков старых крыс (15 мес) со спонтанной гипертензией вызывало деполяризацию на 8 мВ и удлинение APD90 на 39 % уже при растяжении клетки на 2 мкм. У этих же животных растяжение клеток на 4 и 6 мкм во всех случаях вызывало экстра-АР.

У кардиомиоцитов желудочков здоровых крыс (масса тела и возраст которых в работе не были указаны) с использованием patch-clamp в конфигурации whole-cell растяжение клетки в двух капиллярах приводило к деполяризации мембраны и удлинению APD90. Растяжение клетки на 5 мкм в течение 20 с смещало потенциал покоя от (–62,4 ± 1,1) до (–59,7 ± 1,2) мВ. Эта же величина растяжения клетки вызывала увеличение APD90 до (764 ± 50) мс по сравнению с исходной величиной, равной (621 ± 12) мс. APD50 также увеличивалась от (516 ± 19) до (597 ± 22) мс. Однако в этих экспериментах в перфузионном растворе авторы использовали крайне низкую концентрацию ионов Ca^{2+} (0,2 ммоль/л).

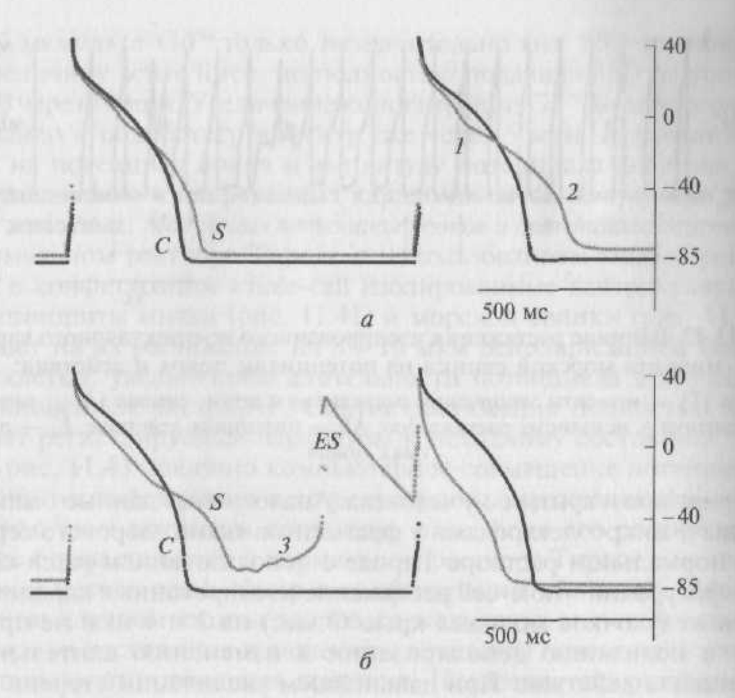


Рис. 11.43. Механоиндуцированная деполяризация мембраны изолированного кардиомиоцита, удлинение потенциала действия и возникновение экстрапотенциалов действия:

а — вентрикулярный миоцит морской свинки, растянутый на 4 мкм. Демонстрируется изменение величины потенциала покоя и формы AP; *б* — вентрикулярный миоцит морской свинки, растянутый на 8 мкм. Демонстрируется изменение величины потенциала покоя, формы AP и возникновение экстра-AP: *C* — контрольная регистрация; *S* — потенциалы растянутой клетки; *ES* — экстра-AP; *1* — фаза ранней реполяризации; *2* — фаза поздней реполяризации; *3* — диастолическая деполяризация

Таким образом, все исследования однозначно демонстрируют два основных реверсибельных процесса, к которым приводит прямое растяжение как предсердных, так и желудочковых кардиомиоцитов — деполяризация мембраны и удлинение APD90. Оба этих процесса приводят к появлению экстра-AP, если деполяризация мембраны (как сумма измененного потенциала покоя и механоиндуцированной деполяризации в виде APD90) достигает критического уровня. Таким образом, одиночные (изолированные) кардиомиоциты желудочков могут генерировать экстра-AP и соответственно экстрасистолы в ответ на растяжение. Мы отмечали выше, что экстрасистолия как реакция на растяжение предсердных клеток не вызывает вопросов. В то же время экстрасистолия изолированных клеток желудочков в ответ на их растяжение не укладывается в эффект Старлинга, при котором имеется растяже-

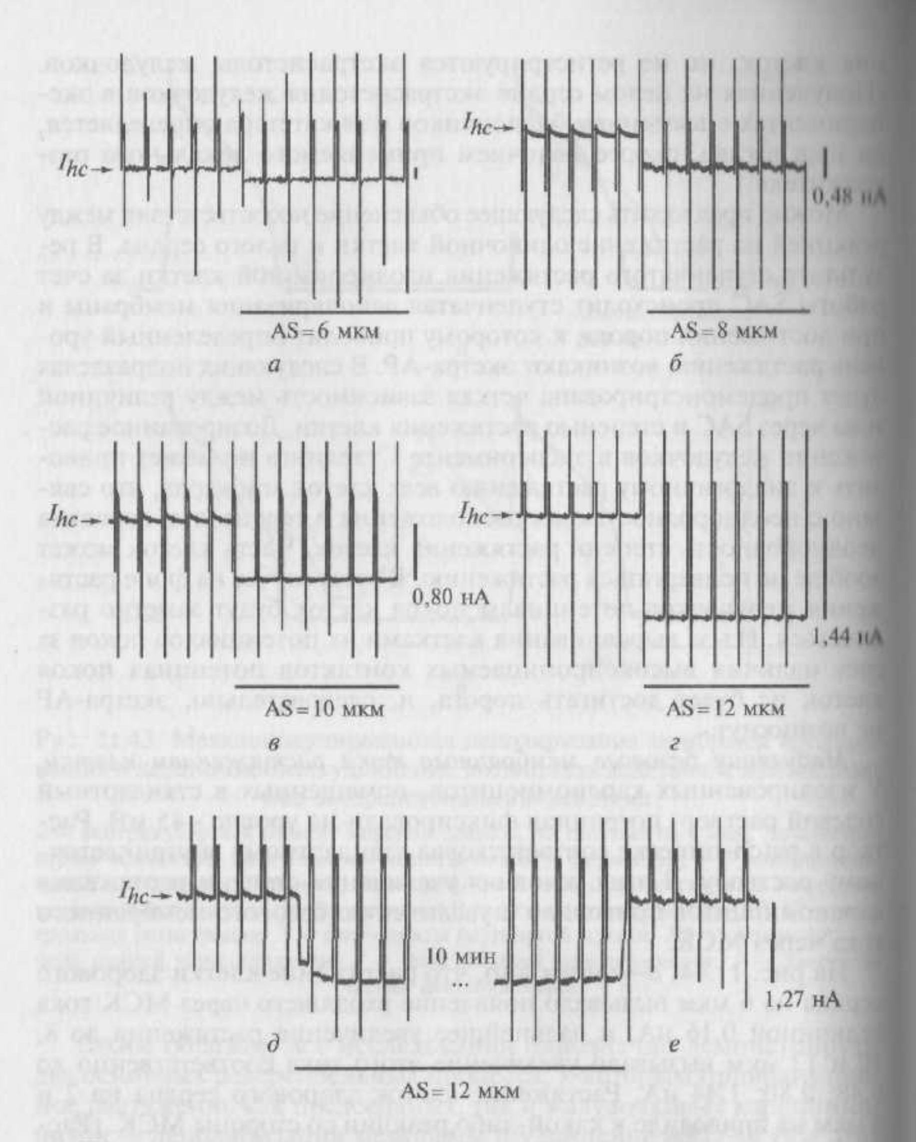
ние клеток, но не регистрируются экстрасистолы желудочков. (Полученная на целом сердце экстрасистолия желудочков в экспериментах с введением баллончиков или катетера определяется, на наш взгляд, скорее наличием применяемого локального раздражителя.)

Можно предложить следующее объяснение несоответствия между реакцией на растяжение одиночной клетки и целого сердца. В результате ступенчатого растяжения изолированной клетки за счет работы SAC происходит ступенчатая деполяризация мембраны и при достижении порога, к которому приводит определенный уровень растяжения, возникают экстра-AP. В следующих подразделах будет продемонстрирована четкая зависимость между величиной тока через SAC и степенью растяжения клетки. Дозированное растяжение желудочков в эксперименте Старлинга не может приводить к аналогичному растяжению всех клеток миокарда, что связано с неоднородностью их расположения в сердце, т.е. вероятна неоднородность степени растяжения клеток. Часть клеток может вообще не подвергаться растяжению. В этом случае на фоне растяжения желудочков потенциалы покоя клеток будут заметно различаться. Из-за выравнивания клетками их потенциалов покоя за счет наличия высокопроницаемых контактов потенциал покоя клеток не будет достигать порога, и, следовательно, экстра-AP не возникнут.

Модуляция базового мембранного тока растяжением клетки. У изолированных кардиомиоцитов, помещенных в стандартный солевой раствор, потенциал фиксировали на уровне −45 мВ. Раствор в patch-пипетке соответствовал стандартному внутриклеточному раствору. В этих условиях увеличение степени растяжения кардиомиоцитов приводило к увеличению базового мембранного тока через МСК.

На рис. 11.44, *а—г* показано, что растяжение клетки здорового сердца на 6 мкм вызывало появление входящего через МСК тока величиной 0,16 нА, и дальнейшее увеличение растяжения до 8, 10 и 12 мкм вызывало увеличение этого тока соответственно до 0,48; 0,80; 1,44 нА. Растяжение клеток здорового сердца на 2 и 4 мкм не приводило к какой-либо реакции со стороны МСК. (Растяжение клетки от исходного уровня до конечных значений происходило очень быстро и определялось только скоростью движения микроманипулятора.) У растянутой до определенного значения клетки базовый мембранный ток через МСК был постоянным в течение нескольких минут регистрации, т.е. инактивация или адаптация не наблюдалась (рис. 11.44, *д*).

У свежеизолированных вентрикулярных кардиомиоцитов здоровой морской свинки потенциал фиксировали на уровне −45 мВ и проводили его смещение импульсами электрического тока длительностью 140 мс и амплитудой в диапазоне от −100 до +100 мВ.



При смещении потенциала относительно поддерживаемого потенциала до −80 мВ (рис. 11.45, *а*) в отсутствие растяжения клетки ток был равен +0,15 нА (символ *С* в начале кривой). При растяжении кардиомиоцита на 12 мкм на фоне поддерживаемого потенциала регистрировали ток, равный −0,65 нА (символ *S* в начале кривой). При поддерживаемом потенциале, равном −45 мВ, дифференциальный ток, индуцируемый растяжением, был равен −80 нА (символ *D* в начале кривой). На фоне ступеньки потенциала величиной −80 мВ ток в отсутствие растяжения клетки был близок нулю и практически не зависел от длительности импульса

Рис. 11.44. Оригинальные кривые тока, зарегистрированного при растяжении кардиомиоцита желудочка мыши при поддерживаемом потенциале (holding potential), равном –45 мВ, при помощи самописца:

а—г — появление и увеличение механоиндуцированного тока (смещение линии вниз) при увеличении степени растяжения кардиомиоцита относительно holding current — тока, возникающего при поддерживаемом потенциале; *д* — длительное растяжение не приводит к адаптации или инактивации механосенситивных ионных каналов. Величина holding current (I_{hc}), регистрируемого при потенциале покоя, показана стрелкой. Перпендикулярные линии представляют собой емкостный ток — артефакт раздражения. Сжатые в развертке прямоугольники на фоне всех регистраций представляют собой характерный для записи на самописце эффект наложения смещения потенциала покоя от –45 до 0 мВ и суммарные токи, которые при этом регистрируются (не видны из-за сжатия развертки). На фоне растяжения клетки величина смещения holding current остается постоянной все время регистрации; AS — величина искусственного растяжения кардиомиоцита

(рис. 11,45, *а*, кривая *С* — на фоне ступеньки). Растяжение клетки меняло этот ток от 0 до –1,3 нА (рис. 11,45, *а*, кривая *S* — на фоне ступеньки), т.е. дифференциальный ток, индуцируемый растяжением, был равен –1,30 нА (см. рис. 11.45, *а*, кривая *D* — на фоне ступеньки) и также практически не зависел от длительности импульса.

При смещении потенциала относительно поддерживаемого потенциала до 0 мВ (рис. 11.45, *б*) растяжение клетки приводило к смещению тока на фоне конца смещающей ступеньки (поздний ток — I_L) от 0,30 до 0,45 нА, т.е. дифференциальный ток, индуцируемый растяжением, был положительным (+ 0,15 нА). Импульс от –45 до 0 мВ индуцировал L-тип Ca^{2+}-тока ($I_{Ca\text{-}L}$), который претерпевал фазу активации и инактивации. Растяжение клетки уменьшало $I_{Ca\text{-}L}$. Дифференциальный Ca^{2+}-ток $I_{Ca\text{-}L}$, индуцируемый растяжением, показан в виде позитивного пика (см. рис. 11.45, *б*, кривая *D* — на фоне ступеньки).

На рис. 11.45, *в* сравниваются *I—V*-кривые I_L-токов до растяжения (пустые символы) с мембранными токами на фоне растяжения (заполненные символы). До растяжения клетки *I—V*-кривые имеют N-форму и пересекают ось потенциала при –74 мВ (потенциал при токе, равном нулю: E_0), что эквивалентно потенциалу покоя у неклампированной клетки. Растяжение клетки на 6 мкм смещает базовый ток в более негативное направление (заполненные треугольники) и E_0 до –70 мВ. Вблизи –10 мВ *I—V*-кривые, зарегистрированные до и после растяжения, пересекаются друг с другом, и при более позитивных потенциалах поздний ток возрастает при растяжении клетки. Растяжение клетки на 10 мкм ещё больше смещает базовый ток в негативное направ-

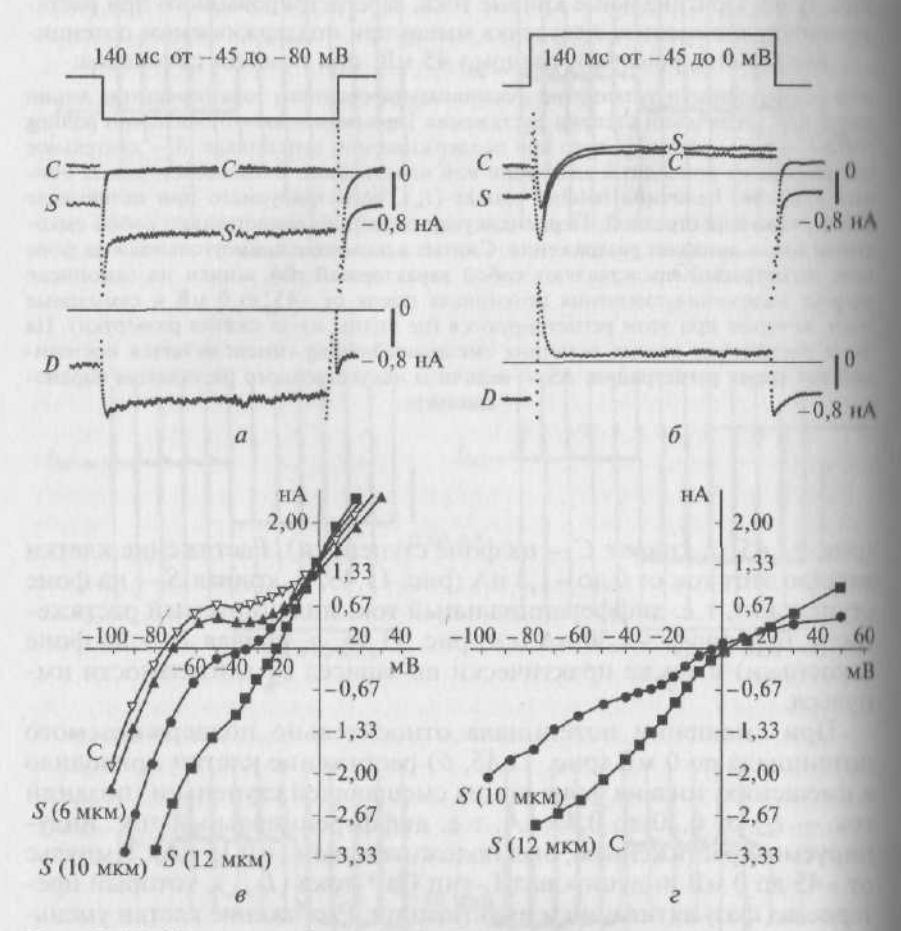


Рис. 11.45. Модуляция базового мембранного тока под действием растяжения на 8 мкм изолированного кардиомиоцита желудочка морской свинки. K^+-ток не подавлен, т. е. и в перфузионном растворе, и в пипетке находятся K^+-катионы:

а, *б* — базовый мембранный ток до (линия *C*) и на фоне (линия *S*) растяжения клетки синхронно с дифференциальным током (линия *D*), регистрируемым на фоне ступеньки импульсного тока длительностью 140 мс от поддерживаемого потенциала −45 до −70 (*а*) и 0 мВ (*б*). Ток на фоне растяжения более негативный, чем в контрольном эксперименте при −45 и −70 мВ, однако более позитивный при 0 мВ; *в*, *г* — вольт-амперные кривые поздних токов, измеренных в конце 140 мс импульса (треугольники), и вольт-амперные кривые, характеризующие работу L-типа Ca^{2+}-каналов (отмечены кружками). Вольт-амперные кривые мембранных токов до растяжения отмечены пустыми символами, а на фоне растяжения клетки на 8 мкм — заполненными; *C* — растяжение клетки индуцирует дифференциальный ток, характеризующийся *I*—*V*-кривой аномального выпрямления с током выходящего направления и потенциалом реверсии (E_{rev}), равным −16 мВ

ление (заполненные кружки), и E_0 деполяризуется до –35 мВ. Значительное растяжение клетки до 12 мкм устраняет N-форму *I—V*-кривой и деполяризует E_0 до –15 мВ (заполненные квадраты).

Разница поздних токов на фоне растяжения за вычетом поздних токов до растяжения представлена как *I—V*-кривые на рис. 11.45, *г*. Две представленные кривые, характеризующие растяжение клетки на 10 (заполненные кружки) и 12 мкм (заполненные квадраты), демонстрируют практически линейные зависимости и реверсию при –5 и 0 мВ соответственно.

Базовый мембранный ток через МСК был зарегистрирован и у вентрикулярных свежеизолированных миоцитов крыс в условиях их перфузии бескальциевым раствором. При помощи самописца авторы регистрировали изменение тока во времени при поддерживаемом потенциале, равном –100 мВ. При растяжении клетки на 2 мкм базовый мембранный ток через МСК активировался без задержки сразу после начала растяжения и сохранялся все время, пока клетка была растянута. При указанном поддерживаемом потенциале I_{SAC} был равен около –100 пА, что при емкости клеток 87 пФ составляет (1,03±0,18) пА/пФ. Снятие растяжения устраняло I_{SAC}. Авторы сообщают, что в бескальциевой среде базовый мембранный ток через МСК появляется при растяжении клеток уже на 1,66 мкм, а зависимость величины базовой мембранной проводимости через МСК от степени растяжения клетки линейна. Эти данные, в принципе, сходны с данными, полученными при растяжении вентрикулярных кардиомиоцитов в условиях стандартного раствора Тироде, содержащего 2 ммоль/л Ca^{2+}. Это свидетельствует о незначительной роли ионов Ca^{2+} в формировании I_{SAC}.

Таким образом, у клеток желудочков был выявлен базовый мембранный ток, который увеличивался при увеличении степени прямого растяжения клетки и уменьшался вплоть до полного исчезновения при снятии растяжения с клетки. Дальнейшие исследования были посвящены разделению этого базового механоиндуцированного тока на компоненты.

Ток, активируемый растяжением клетки (I_{SAC}). Чтобы разделить базовый ток на токовые компоненты у кардиомиоцитов желудочков морской свинки, крысы и мыши токи через калиевые каналы (I_K) были подавлены заменой K^+ на Cs^+ и в цитозоле и в перфузионной камере ($[Cs^+]_{in}/[Cs^+]_{out}$). В цитозоле замена осуществлялась посредством диализа из пипетки цезиевого раствора, а в перфузионной камере — путем замены 5,4 ммоль/л KCl на 5,4 ммоль/л CsCl (токи, активируемые растяжением и регистрируемые при этих условиях, были обозначены как I_{SAC}).

У кардиомиоцитов морских свинок с блокированным I_K растяжение на 8 мкм вызывало входящие токи при всех негативных потенциалах (рис. 11.46). Токи, вызванные растяжением, сопровождались линейной *I—V*-зависимостью, реверсировались при

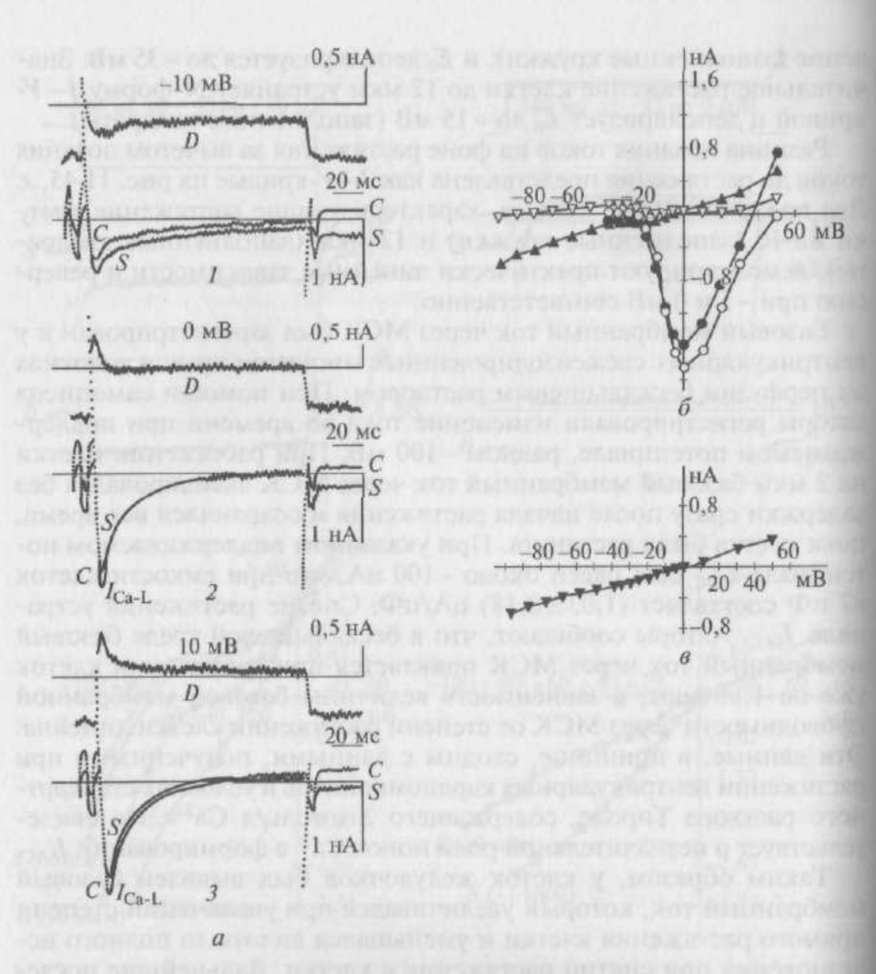


Рис. 11.46. Активация растяжением неселективного катионного тока при растяжении кардиомиоцита желудочка морской свинки на 8 мкм в условиях подавленного цезием калиевого тока:

а — модуляция растяжением мембранных токов на фоне ступеньки импульсного тока длительностью 140 мс от поддерживаемого потенциала –45 до –10 мВ (*1*), 0 (*2*) и +10 мВ (*3*); *б* — *I—V*-кривые поздних токов, измеренных в конце импульса 140 мс (треугольники), и *I—V*-кривые, характеризующие работу L-типа Ca^{2+}-каналов (кружки); *I—V*-кривые мембранных токов до растяжения отмечены пустыми символами, а на фоне растяжения клетки на 8 мкм — заполненными; *в* — растяжение клетки индуцирует дифференциальный ток, характеризующийся линейной *I—V*-кривой и потенциалом реверсии (E_{rev}), равным 0 мВ

E_{rev} = (–5 ± 3) мВ и полностью блокировались Gd^{3+} в концентрации 5 мкмоль/л.

Ток SAC у вентрикулярных свежеизолированных миоцитов крыс в условиях их перфузии бескальциевым раствором также блоки-

ровался Gd^{3+}, однако в этой работе авторы применяли очень высокие для изолированных клеток концентрации Gd^{3+}. Так, введение в перфузионный раствор 40 мкмоль/л Gd^{3+} блокировало I_{SAC} на 60 %, а применение 100 мкмоль/л Gd^{3+} — на 90 %. Авторы сообщают о частичном восстановлении I_{SAC} после отмывания в течение 5 мин.

С подавленным ионами Cs^+ K^+-током до растяжения клетки *I—V*-кривые позднего тока были линейными и имели E_0 около −35 мВ (рис. 11.47, *а* — пустые треугольники). Растяжение кардиомиоциты на 6 мкм смещало поздние токи в более негативную область, если ступеньки тестирующих потенциалов были негативными (рис. 11.47, *а* — заполненные кружки). Растяжение смещало E_0 до −10 мВ. Позитивные тестирующие ступеньки смещали ток в выходящее направление. Дифференциальный ток I_{SAC} имел линейную *I—V*-зависимость и реверсировался при −5 мВ (рис. 11.47, *б* — заполненные кружки). Обычно эксперименты заканчивались добавлением Gd^{3+} в концентрации 5 мкмоль/л при продолжающемся растяжении. Он смещал кривую I_L вверх, а E_0 гиперполяризовал от −10 до −90 мВ (см. рис. 11.47, *а* — заполненные квадраты). Ток, регистрируемый в присутствии Gd^{3+} и растяжения, был всегда более позитивным, чем контрольный ток до растяжения. Gd^{3+}-Сенситивная дифференциальная кривая (см. рис. 11.47, *б* — заполненные квадраты) имела линейную зависимость и реверсировалась при + 20 мВ.

Было показано, что I_{SAC} не является Ca^{2+}-активируемым током. В изолированные кардиомиоциты из пипетки, заполненной раствором, содержащим ионы Cs^+ вместо ионов K^+, вводили 5 ммоль/л BAPTA. Было показано, что амплитуда I_{SAC} у растянутых на сходную величину клеток равна друг другу вне зависимости от того, диализована или нет клетка BAPTA (рис. 11.47, *в*). Присутствие BAPTA не модифицирует I_{SAC}, однако устраняет (как это и должно быть) влияние растяжения на Ca^{2+}-ток. Локальное растяжение обычно уменьшает Ca^{2+}-ток, но введение BAPTA устраняет этот эффект. В присутствии BAPTA, так же как и в отсутствие этого хелатора Ca^{2+}, Gd^{3+} в концентрации 5 ммоль/л устраняет эффект растяжения.

Сравнение рис. 11.45, *в* с рис. 11.46, *в* показывает, что токи, активируемые растяжением, имеют линейную *I—V*-зависимость только тогда, когда калиевые токи подавлены, например, внутриклеточным диализом ионов Cs^+. Отличие тока, вызванного растяжением и регистрируемого после Cs^+-блока калиевых каналов, от тока, который регистрируется до Cs^+-блока калиевых каналов, предполагает, что растяжение активировало Cs^+-чувствительный ток через каналы аномального выпрямления входящей направленности с реверсным потенциалом −90 мВ, т.е. калиевый ток. Эти данные о механической активации калиевых токов подтверж-

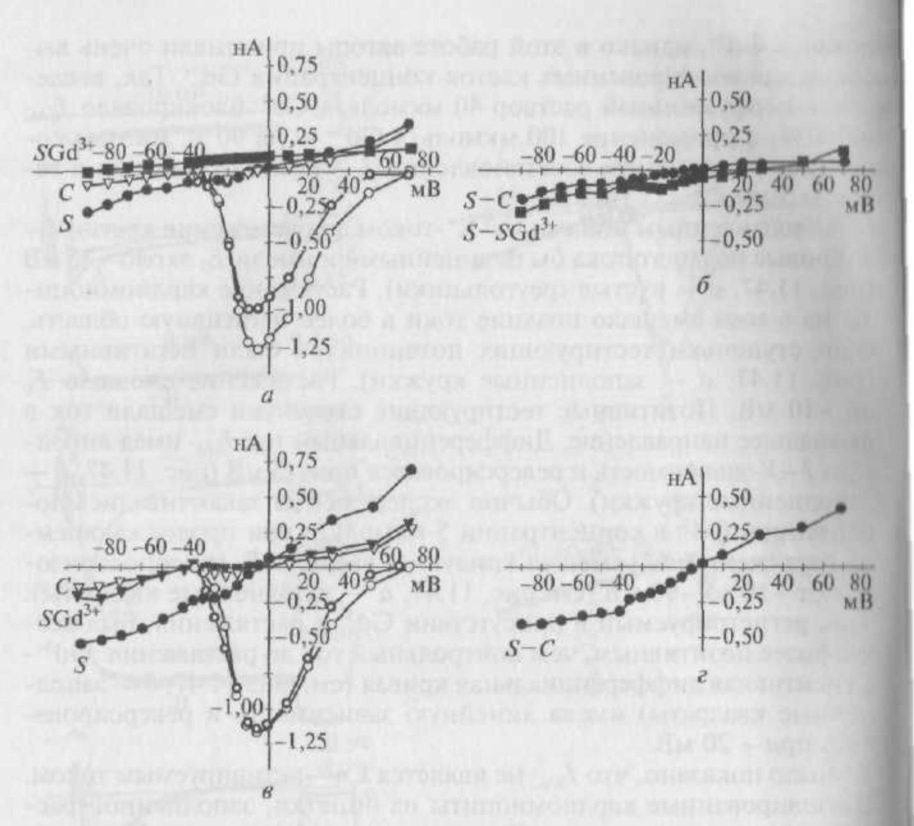


Рис. 11.47. Локальное растяжение активирует Gd^{3+}-сенситивный ток через stretch-activated неселективные катионные каналы (I_{SAC}) и уменьшает ток через L-тип Ca^{2+}-каналы (I_{Ca}); K^+-токи подавлены:

а — *I*—*V*-кривые для I_L в контроле (*С*) до растяжения (пустые треугольники) на фоне растяжения величиной 6 мкм (*S*, заполненные кружки) и на фоне растяжения величиной 6 мкм при аппликации в течение 10 мин 5 мкмоль/л Gd^{3+} (SGd^{3+}, заполненные квадраты). Контрольный пиковый I_{Ca} (*С*, круги) уменьшен при растяжении (*S*, полужирные кружки); *б* — активированные растяжением дифференциальные токи (I_{SAC}): круги — I_L в течение растяжения минус контрольные I_L (*S*—*С*); заполненные квадраты — ситуация на фоне растяжения (до аппликации минус после аппликации Gd^{3+}: $S—SGd^{3+}$); *в*, *г* — I_{SAC} и I_{Ca} после диализа клетки раствором ВАРТА в концентрации 5 мкмоль/л. Поздний ток в контроле (*С*, пустые треугольники) на фоне растяжения величиной 10 мкм (*S*, точки) и в течение растяжения после 5 мин аппликации 5 мкмоль/л Gd^{3+} (SGd^{3+}, заполненные треугольники). Обратите внимание, что в присутствии ВАРТА I_{Ca} в контроле (*С*, кружки) и на фоне растяжения (*S*, полужирные кружки) не отличаются (*в*). Активированные растяжением дифференциальные токи (*S*—*С*), E_{rev} = 0 мВ (*г*)

даются ранним сообщением, в котором описывается эффект растяжения вентрикулярных миоцитов морской свинки. В течение растяжения клетки постоянный входящий ток I_{SAC}, равный пример-

но –500 пА, должен вызывать внутриклеточную аккумуляцию ионов натрия и кальция, и эта аккумуляция ионов, вероятно, может вторично модифицировать другие токовые компоненты. Разумеется, результаты на Cs^+-диализированных клетках (подавление I_K) показывают, что растяжение подавляет $I_{Ca\text{-}L}$ через L-тип Ca^{2+}-каналов. Оценка *I—V*-характеристик показывает, что растяжение подавляет $I_{Ca\text{-}L}$ на (15 ± 3) % у кардиомиоцитов здоровых морских свинок. Это подавление не регистрируется, когда клетка диализируется в течение 5 мин до растяжения с помощью добавления 5 ммоль/л ВАРТА. В то же время механическая индукция I_{SAC} остается немодифицированной. Эффект ВАРТА, вероятно, есть следствие хелации ионов кальция. Таким образом, вызванное растяжением уменьшение $I_{Ca\text{-}L}$ может быть объяснено как кальциевая инактивация вследствие внутриклеточной кальциевой аккумуляции. Суммируя приведенные данные, можно заключить, что растяжение модулирует потенциалы покоя и действия не за счет какого-либо единичного токового компонентов, а за счет нескольких ионных компонентов тока. Сравнение амплитуды этих механочувствительных компонентов тока позволяет заключить, что мембранная деполяризация и удлинение потенциала действия доминируют и связаны с механосенситивной активацией I_{SAC}.

У кардиомиоцитов желудочков морской свинки и крысы ток, вызванный растяжением клетки, был нечувствителен к замене ионов Cl^- на аспартатные ионы, и, следовательно, I_{SAC} должен определяться катионами, а не хлорными ионами. В этих экспериментах CsCl был заменен на Cs-аспартат. Уменьшение внутриклеточной концентрации Cl^- смещало потенциал равновесия для Cl^- E_{Cl} от 0 до –73 мВ. Вольт-амперная кривая до растяжения клетки была линейной с величиной E_0, равной –35 мВ (рис. 11.48, *а* — пустые треугольники). Растяжение клетки на 8 или 12 мкм (см. рис. 11.48, *а* — заполненные кружки и квадраты соответственно) индуцировало появление негативных токов и смещало до –10 мВ, как это и было при нормальной концентрации ионов Cl^-. Токи, индуцируемые растяжением I_{SAC}, имели линейную *I—V*-зависимость от потенциала и реверсировались в 0 мВ (рис. 11.48, *б*).

У вентрикулярных свежеизолированных миоцитов крыс в условиях перфузии бескальциевым раствором замена Cl^- на F^- также свидетельствовала о том, что I_{SAC} должен определяться катионами, а не хлорными ионами.

Для того чтобы определить вклад ионов Ca^{2+} в I_{SAC}, было выполнено два типа экспериментов. В первой серии концентрация ионов Ca^{2+} в перфузионном растворе была уменьшена от 1,8 ммоль/л до номинального нуля (иначе говоря, приблизительно до 6 мкмоль/л, которые содержатся в деионизированной воде). Отсутствие ионов Ca^{2+} в перфузионном растворе увеличивало индуцируемую растяжением неселективную проводимость, и вели-

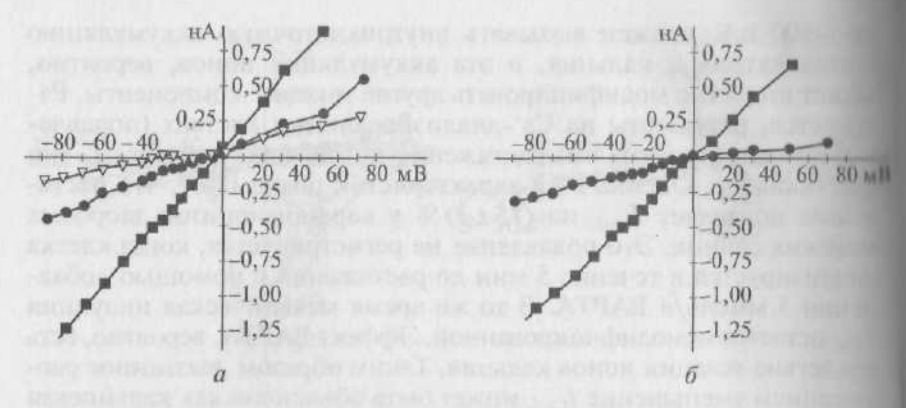


Рис. 11.48. Ток SAC не чувствителен к изменениям градиента Cl^-. K^+-токи подавлены. Цитозольная концентрация $[Cl^-]$ была уменьшена от 151 до 10 ммоль/л диализом из patch-пипетки, в который 140 ммоль/л CsCl было заменено 140 ммоль/л Cs-аспартата. Равновесный потенциал Cl^-, как можно полагать, изменяется от 0 до −73 мВ:

а — *I*—*V*-кривая до растяжения (пустые треугольники) и фоне растяжения величиной 8 (заполненные кружки) или 12 мкм (заполненные квадраты); *б* — дифференциальные токи (I_{SAC}), активированные растяжением на 8 (заполненные кружки, E_{rev} = 0 мВ) или 12 мкм (заполненные квадраты, E_{rev} = 0 мВ)

чина I_{SAC} была больше приблизительно в 2,5 раза. Несмотря на большую амплитуду, I_{SAC} возрастал с увеличением растяжения. Поскольку зависимость от потенциала и E_{rev} не менялись при устранении ионов Ca^{2+}, было предположено, что внеклеточная концентрация этих катионов уменьшает проводимость g_{SAC} для одновалентных катионов.

Во второй серии экспериментов была проведена замена во внеклеточном растворе 150 ммоль/л NaCl при 0 ммоль/л $CaCl_2$ на 75 ммоль/л $CaCl_2$ при 0 ммоль/л NaCl. Перегрузка внутриклеточного кальция была устранена диализом 5 ммоль/л ВАРТА. В отсутствие растяжения клетки замена 150 ммоль/л NaCl на 75 ммоль/л $CaCl_2$ уменьшала слоп проводимости и смещала E_0 от −40 до −60 мВ (рис. 11.49, *б* — изменение от пустых треугольников до заполненных кружков). Замена ионов Na^+ на ионы Ca^{2+} при длящемся растяжении устраняла негативный I_{SAC}. При поддерживаемом потенциале, равном −45 мВ, ток становился положительным (рис. 11.49, *а*). Вольт-амперная кривая была позитивнее до E_0, равного −95 мВ (рис. 11.49, *в* — заполненные квадраты). При позитивных потенциалах замена 150 ммоль/л NaCl на 75 ммоль/л $CaCl_2$ уменьшала индуцируемый растяжением выходящий ток. Вероятно, замена ионов не только уменьшает I_{SAC}, но также активирует позитивный ток. Результаты предполагают, что ионы кальция могут проникать через SAC, хотя их проницаемость значительно меньше,

чем проницаемость для ионов натрия, и ионы кальция могут взаимодействовать с белками SAC каналов в течение прохождения. (Быстрый блок SAC Ca^{2+} и Gd^{3+}.)

Ионная селективность I_{SAC}. Как и ожидалось для неселективных катионных каналов, замена Na^+ большими катионами N-метил-D-глюкозамина ($NMDG^+$) редуцирует I_{SAC} (−45 мВ), но не устраняет его полностью. Регистрация процесса на самописце, представленная на рис. 11.50, *а*, показывает, что растяжение клетки на 10 мкм индуцирует I_{SAC} величиной 0,9 нА при −45 мВ и что замена Na^+ на $NMDG^+$ уменьшает эту величину до −0,11 нА (при подавленном K^+-токе). Вольт-амперные кривые, отражающие замену Na^+ на $NMDG^+$, при растяжении клетки на 10 мкм уменьшают

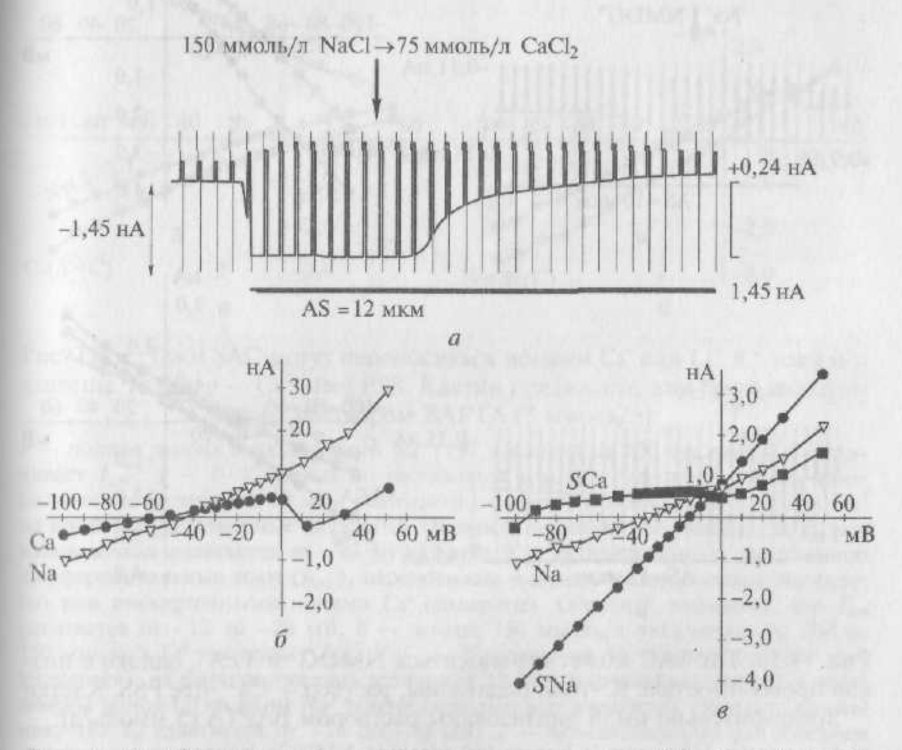


Рис. 11.49. Модуляция I_{SAC} заменой внеклеточного 150 ммоль/л NaCl, 0 ммоль/л $CaCl_2$ на 0 ммоль/л NaCl, 75 ммоль/л $CaCl_2$. K^+-токи подавлены. Клетки до эксперимента диализованы с 5 ммоль/л BAPTA:

а — оригинальная кривая, зарегистрированная на самописце; растяжение величиной 12 мкм стимулирует I_{SAC} −1,45 нА. На фоне непрерывного растяжения замена ионов Na^+ на ионы Ca^{2+} изменяла ток до +0,24 нА; *б* — эффект замены ионов Na^+ на ионы Ca^{2+} в отсутствие растяжения (пустые треугольники до замены раствора; заполненные кружки после замены); *в* — *I—V*-кривые до растяжения (пустые треугольники), на фоне растяжения величиной 12 мкм до (заполненные кружки) и после замены Na^+ на Ca^{2+} (заполненные квадраты)

слоп проводимости и смещают E_0 от –27 до –52 мВ (рис. 11.50, *б* — изменения от заполненных кружков до заполненных квадратов); E_{rev} для тока, индуцируемого растяжением, равна –15 мВ при 150 ммоль/л NaCl и –53 мВ при замене Na^+ на $NMDG^+$.

Замена 150 ммоль/л внеклеточного Na^+ на 150 ммоль/л TEA^+ редуцирует I_{SAC} (–45 мВ, 12 мкм растяжения клетки) от –1,4 до –0,35 нА (рис. 11.50, *в*). Замена Na^+ на TEA^+ в течение продолжа-

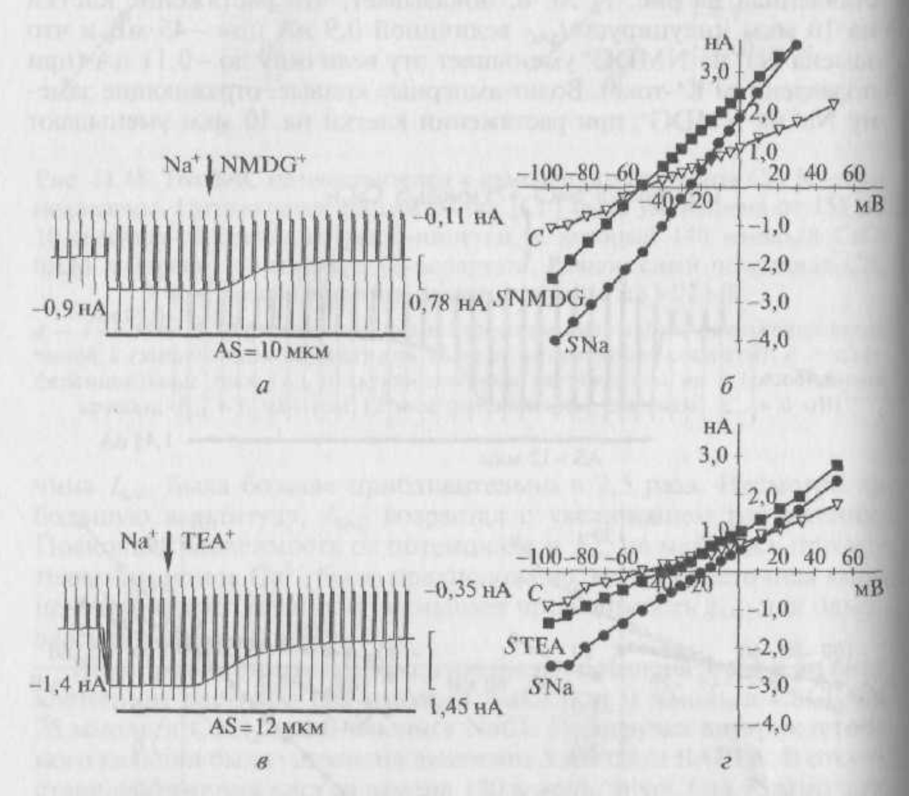


Рис. 11.50. Ток SAC может переноситься $NMDG^+$ и TEA^+, однако с низкой проводимостью. K^+-токи подавлены, раствор — Ca^{2+}-free PSS. Клетки предварительно были диализованы раствором BAPTA (5 ммоль/л):

а, *б* — замена 150 ммоль/л Na^+ на 150 ммоль/л $NMDG^+$; оригинальная кривая, зарегистрированная на самописце; растяжение величиной 10 мкм стимулирует I_{SAC} –0,9 нА. Замена Na^+ на $NMDG^+$ уменьшает I_{SAC} до –0,11 нА. Вольт-амперные кривые до растяжения (пустые треугольники), на фоне растяжения величиной 12 мкм (заполненные кружки) и после замены Na^+ на $NMDG^+$ (заполненные квадраты); *в*, *г* — замена 150 ммоль/л Na^+ на 150 ммоль/л TEA^+; оригинальная кривая, зарегистрированная на самописце; растяжение величиной 12 мкм стимулирует I_{SAC} до 1,4 нА, замена Na^+ на TEA^+ уменьшает I_{SAC} до –0,35 нА; вольт-амперные кривые до растяжения (открытые треугольники), на фоне растяжения величиной 10 мкм (заполненные кружки) и после замены Na^+ на TEA^+ (заполненные квадраты)

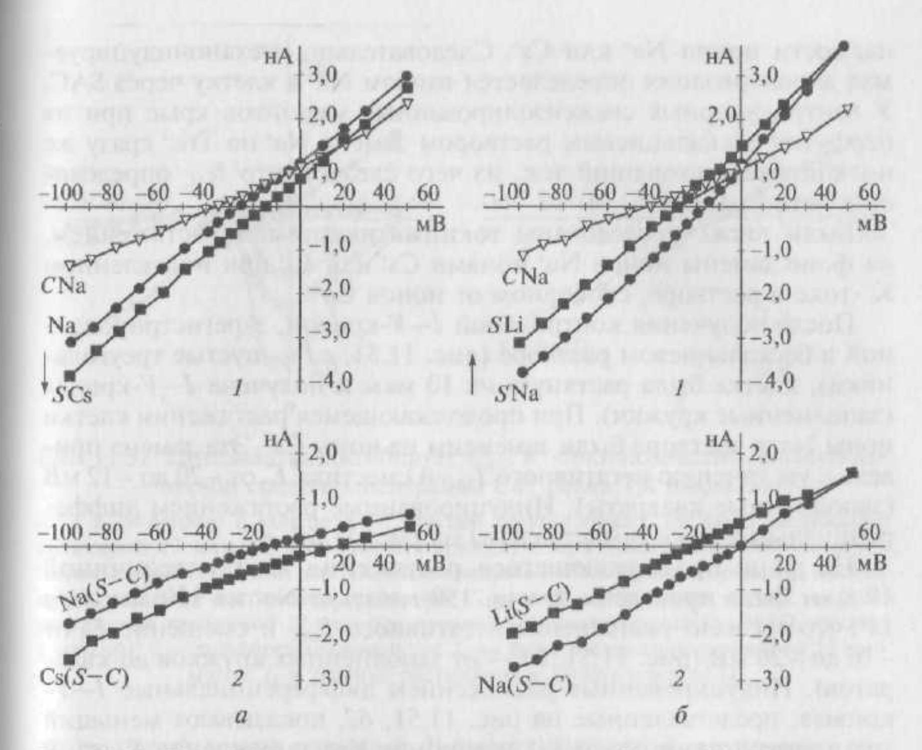


Рис. 11.51. Токи SAC могут переноситься ионами Cs^+ или Li^+. K^+-токи подавлены. Раствор — Ca^{2+}-free PSS. Клетки предварительно были диализованы раствором BAPTA (5 ммоль/л):

а — полная замена внеклеточного Na^+ (150 ммоль/л) на 150 ммоль/л Cs^+ увеличивает I_{SAC}; *1* — *I*—*V*-кривые до растяжения (пустые треугольники), на фоне растяжения величиной 10 мкм (заполненные круги) и после замены ионов Na^+ на ионы Cs^+ (заполненные квадраты). Обратите внимание, что потенциал E_0 при нулевом токе сдвигается от −20 до −12 мВ; *2* — активированные растяжением дифференциальные токи (I_{SAC}), переносимые внеклеточными ионами Na^+ (круги) или внеклеточными ионами Cs^+ (квадраты). Обратите внимание, что E_{rev} сдвигается от −12 до +20 мВ; *б* — замена 150 ммоль/л внеклеточного Na^+ на 150 ммоль/л Li^+ уменьшает I_{SAC}; *1* — *I*—*V*-кривые до растяжения (пустые треугольники), на фоне растяжения величиной 12 мкм (заполненные круги) и после замены ионов Li^+ на ионы Na^+ замена (заполненные квадраты). Обратите внимание, что E_0 сдвигается от −16 до −28 мВ; *2* — активированные растяжением дифференциальные токи (I_{SAC}), переносимые ионами Na^+ (круги) или Li^+ (квадраты). Обратите внимание, что E_{rev} сдвигается от 0 до −20 мВ

ющегося растяжения клетки меняет слоп проводимости *I*—*V*-кривой, смещая E_0 от −16 мВ (Na^+, заполненные кружки на рис. 11.50, *г*) на −31 мВ (см. рис. 11.50, *г* — заполненные квадраты) и смещает E_{rev} I_{SAC} от +11 до −20 мВ.

Результаты показывают, что и TEA^+, и $NMDG^+$ могут проникать через SAC, хотя их проницаемость несравнимо ниже прони-

цаемости ионов Na^+ или Cs^+. Следовательно, механоиндуцируемая деполяризация определяется входом Na^+ в клетку через SAC. У вентрикулярных свежеизолированных миоцитов крыс при их перфузии бескальциевым раствором замена Na^+ на $Tris^+$ сразу же ингибировала входящий ток, из чего следует, что I_{SAC} определяется катионами Na^+.

Были также исследованы токи, активируемые растяжением, на фоне замены ионов Na^+ ионами Cs^+ или Li^+ при подавленном K^+-токе в растворе, свободном от ионов Ca^{2+}.

После получения контрольной *I—V*-кривой, зарегистрированной в бескальциевом растворе (рис. 11.51, *a1* — пустые треугольники), клетка была растянута на 10 мкм и получена *I—V*-кривая (заполненные кружки). При продолжающемся растяжении клетки ионы Na^+ в растворе были заменены на ионы Cs^+. Эта замена привела к увеличению негативного I_{SAC} и сместила E_0 от –20 до –12 мВ (заполненные квадраты). Индуцированные растяжением дифференциальные токи представлены на рис. 11.51, *a2*.

На фоне продолжающегося растяжения клетки величиной 10 мкм была проведена замена 150 ммоль/л Na^+ на 150 ммоль/л Li^+, что вызвало уменьшение негативного I_{SAC} и смещение E_0 от –16 до –20 мВ (рис. 11.51, *б1* — от заполненных кружков до квадратов). Индуцированные растяжением дифференциальные *I—V*-кривые, представленные на рис. 11.51, *б2*, показывают меньший ток в присутствии ионов Li^+, чем ионов Na^+, и смещение E_0 от –0 до –20 мВ.

Цитохалазин D ингибирует I_{SAC}. На рис. 11.52, *а* показаны *I—V*-кривые в контроле на фоне растяжения величиной 12 мкм и при применении 100 ммоль/л цитохалазина D. Очевидно, что цитохалазин D полностью ингибирует I_{SAC}. Это же демонстрирует рис. 11.52, *б*, на котором представлен дифференциальный ток I_L на фоне растяжения за вычетом I_L на фоне растяжения при применении цитохалазина D.

Компрессия изолированных кардиомиоцитов. Совершенно очевидно, что в мультицеллюлярном препарате сердца каждая клетка испытывает и растяжение, и сжатие в фазы сокращения и релаксации препарата. Большинство кардиомиоцитов так или иначе испытывают компрессию в течение каждого сокращения (в период систолы), поэтому вопрос о влиянии искусственного сжатия клетки и реакции МСК на это сжатие представляется крайне важным для описания. Прежде всего напомним, что изолированные кардиомиоциты напоминают кирпичи и, следовательно, имеют узкую и широкую стороны (см. рис. 11.16). По неясным причинам кардиомиоциты могут даже в протоке прилипать к стеклянному дну перфузионной камеры либо узкой, либо широкой стороной. Тогда под микроскопом кардиомиоцит в части случаев может иметь вид узкой и длинной клетки, но это значит лишь то, что он при-

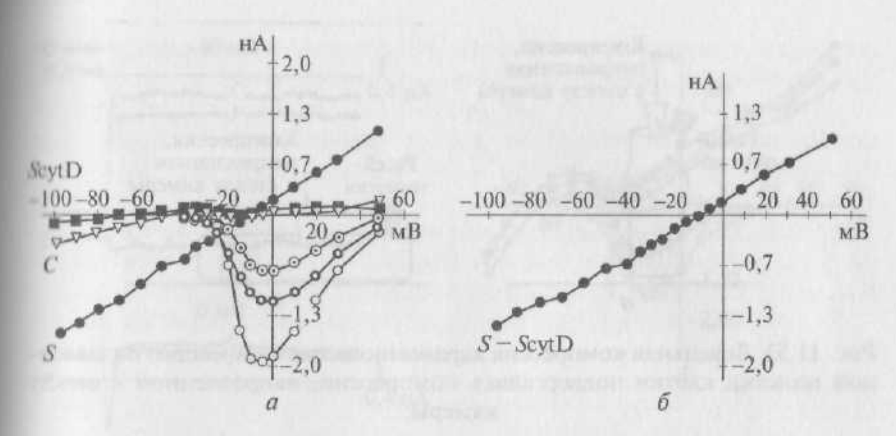


Рис. 11.52. Цитохалазин ингибирует I_{SAC}. K^+-токи подавлены. Во внеклеточной среде концентрация Ca^{2+} равна 1,8 ммоль/л:

а — *I*—*V*-кривые в контроле (*C*, пустые треугольники), на фоне растяжения величиной 12 мкм (*S*, заполненные кружки) и при применении 100 мкмоль/л цитохалазина D (5 мин, заполненные квадраты). Пик I_{Ca} в контроле (*C*, пустые круги), на фоне растяжения величиной 12 мкм (*S*, полужирные круги), на фоне растяжения величиной 12 мкм при применении цитохалазина D (*S*cytD, кружки с точкой); *б* — дифференциальный ток I_L на фоне растяжения величиной 12 мкм минус I_L в течение растяжения с цитохалазином D

лип к стеклу узкой стороной. В других случаях кардиомиоцит виден как широкая клетка, т.е. он прилип к стеклу широкой стороной. Поворот кардиомиоцита с узкой стороны на широкую с помощью patch-пипетки продемонстрирован на рис. 11.16.

При изучении влияния компрессии кардиомиоцита на реакцию МСК было обнаружено удивительное явление. Эта реакция различалась в зависимости от того, на какой стороне лежал кардиомиоцит — на узкой или на широкой. Кардиомиоциты подвергались локальной компрессии с помощью оплавленной пипетки (см. рис. 11.12 — левая часть), причем компрессия была направлена к стеклу камеры и в случае, если кардиомиоцит лежал на узкой стороне (рис. 11.53, *а*), и в случае, если он лежал на широкой стороне (рис. 11.53, *б*).

На рис. 11.54 продемонстрирован эффект локального сдавливания кардиомиоцита, лежащего на узкой стороне (edgewise position) и находящегося в условиях перфузии клеток раствором со стандартной внеклеточной концентрации ионов K^+. В patch-пипетке находится раствор, содержащий стандартную внутриклеточную концентрацию ионов K^+. Эта конфигурация растворов записывается как $[K^+]_{in}/[K^+]_{out}$. В течение сжатия зарегистрировали деполяризацию потенциала покоя и уменьшение I_{K1}. Зависимость от потенциала токов, индуцированных сжатием, напомнила зависимость от напряжения токов, индуцированных

Рис. 11.53. Локальная компрессия кардиомиоцитов. С помощью оплавленной пипетки клетки подвергались компрессии, направленной к стеклу камеры:

а — кардиомиоцит лежит на узкой стороне; *б* — кардиомиоцит лежит на широкой стороне

растяжением (см. рис. 11.45, *в*). Наблюдаемое уменьшение I_{K1} было блокировано неселективным блокатором Gd^{3+} в концентрации 8 мкмоль/л. Гадолиний также блокирует L-тип кальциевых каналов у изолированных вентрикулярных миоцитов морской свинки, мыши и человека. Кроме того, он блокирует K^+-каналы задержанного выпрямления (delayed rectifier K^+-channels) в изолированных вентрикулярных миоцитах морской свинки. Однако было возможно допустить активацию I_{PA} (тока, активируемого сдавливанием, — PA) через неселективные катионные каналы. Негативный I_{PA} быстро появляется и исчезает после применения и устранения сжатия соответственно. Он был равен (−0,12 ± 0,04) нА при 2 мкм; (−0,28 ± 0,05) нА при 4 мкм; (−0,32 ± 0,02) нА при 6 мкм и (−0,70 ± 0,1) нА при 8 мкм сжатия (при −45 мВ). Сжатие также уменьшило I_{Ca}. Так как этот эффект был предотвращен внутриклеточным диализом 5 ммоль/л BAPTA, уменьшенный I_{Ca} может быть вызван увеличенной целлюлярной концентрацией Ca^{2+}.

Таким образом, клетки, лежащие на узкой стороне (edgewise position), отвечают на сжатие деполяризацией покоящейся мембраны и уменьшением I_{K1} через K^+-каналы аномального выпрямления с током входящего направления (inwardly-rectifying K^+-channels).

После блокирования K^+-токов, вызванного заменой внеклеточных и внутриклеточных ионов K^+ на ионы Cs^+ (рис. 11.55, *а*), сжатие даже на 8 мкм не индуцирует появление I_{PA}. Однако растяжение на 8 мкм той же самой клетки во всех случаях приводило к появлению I_{SAC} через неселективные катионные каналы (см. рис. 11.55, *а*). Нельзя сказать, что сжатие по сравнению с растяжением клетки не влияет на кардиомиоцит, потому что в отсутствие BAPTA в обоих случаях (при сжатии и растяжении) наблюдается

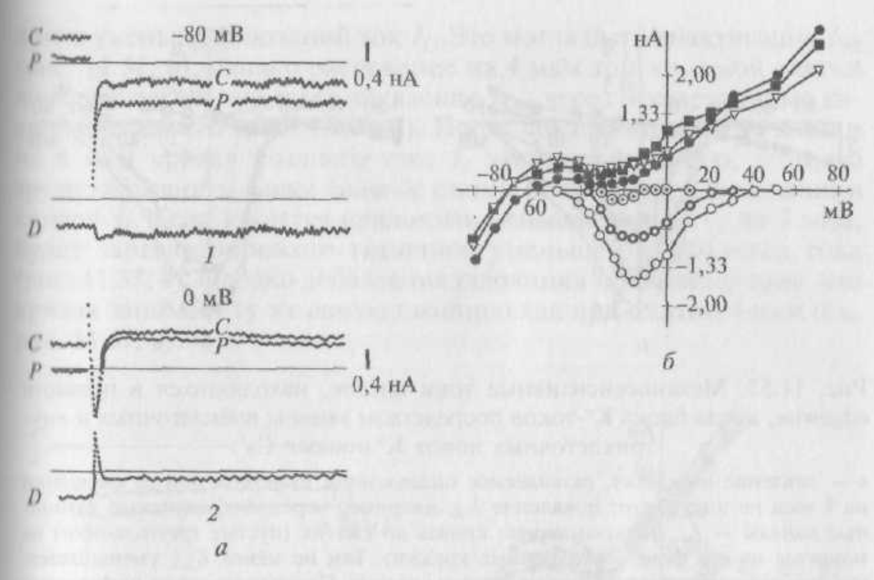


Рис. 11.54. Давление на клетку, развиваемое оплавленной пипеткой при ее смещении на 6 мкм. Клетка находится в позиции edgewise в конфигурации растворов $[K^+]_{in}/[K^+]_{out}$:

а — начинаясь от поддерживаемого потенциала величиной –45 мВ, мембранный потенциал был смещен импульсом длительностью 140 мс до –80 (*1*) и 0 мВ (*2*) соответственно. Показаны базовые мембранные токи в контроле (маркированы как *C*) и в течение приложения механического давления (маркированы как *P*). Показаны дифференциальные токи, вызванные сжатием клетки (маркированы как *D*). Обратите внимание, что активированный сжатием ток более негативен, чем ток перед сжатием при потенциалах –80, –45 и 0 мВ. Ток является входящим при –45 и –80 мВ; *б* — *I*—*V*-кривые поздних токов I_L, измеренных в конце тестирующего импульса (пустые треугольники — перед сжатием; заполненные кружки — в течение сжатия на 6 мкм; заполненные квадраты — в течение сжатия на 6 мкм после аппликации Gd^{3+}). Обратите внимание, что $I_{Ca\text{-}L}$ уменьшается в течение сжатия клетки (пустые кружки по сравнению с пустыми жирными кружками). Гадолиний блокирует $I_{Ca\text{-}L}$ (белые кружки с точкой)

уменьшение L-типа кальциевого тока (рис. 11.56). Гадолиний не оказывает влияния на I_L на фоне ее сжатия даже на 8 мкм (рис. 11.56, *б*). Все три кривые: контрольная кривая I_L, которая зарегистрирована до компрессии клетки, кривая I_L на фоне сжатия и после добавления гадолиния, сходны во всех экспериментах. Конечно, Gd^{3+} устраняет I_{SAC} через неселективные катионные каналы в течение растяжения кардиомиоцитов. Таким образом, I_{K1} негативнее –45 мВ был блокирован заменой внеклеточных и внутриклеточных ионов K^+ на ионы Cs^+.

В целом сдавление клетки, которая лежит на узкой стороне (т. е. находится в позиции edgewise) в условиях $[K^+]_{in}/[K^+]_{out}$, модулирует I_{K1}. Эффект сжатия клеток, лежащих в этом положении, не

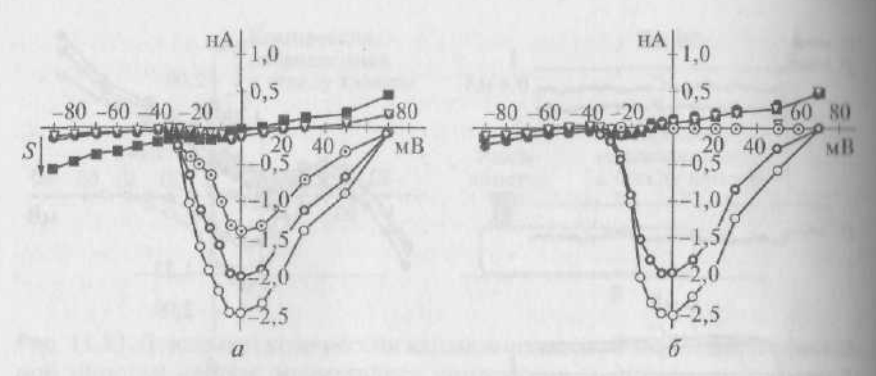


Рис. 11.55. Механосенситивные токи клеток, находящихся в позиции edgewise, после блока K^+-токов посредством замены внеклеточных и внутриклеточных ионов K^+ ионами Cs^+:

а — давление на клетку, развиваемое оплавленной пипеткой при ее смещении на 8 мкм не индуцирует появление I_{PA}, например через неселективные катионные каналы — I_{ns}. Вольт-амперная кривая до сжатия (пустые треугольники) не меняется на его фоне (заполненные кружки). Тем не менее $I_{Ca\text{-}L}$ уменьшается, что свидетельствует о реакции со стороны клетки. После устранения компрессии ту же самую клетку растягивали на 8 мкм. Растяжение приводило к появлению I_{SAC} (заполненные квадраты). Обратите внимание на $I_{Ca\text{-}L}$ до сжатия (пустые кружки), на фоне сжатия (пустые полужирные кружки) и при растяжении (пустые кружки с точкой); *б* — другая клетка, находящаяся в растворе конфигурации $[Cs^+]_{in}/[Cs^+]_{out}$. Давление на клетку, развиваемое оплавленной пипеткой при ее смещении на 8 мкм, не стимулировало входящий I_{ns} (пустые треугольники до компрессии по сравнению с заполненными кружками на фоне сжатия), и добавление Gd^{3+} не изменяло поздние токи (заполненные квадраты). Однако $I_{Ca\text{-}L}$ подавлен, поэтому можно предположить, что сжатие было эффективно (пустые кружки перед сжатием по сравнению с пустыми жирными кружками). Гадолиний блокировал $I_{Ca\text{-}L}$ (пустые кружки с точкой)

проявляется в условиях $[Cs^+]_{in}/[Cs^+]_{out}$, хотя клетки реагируют на деформацию уменьшением $I_{L\text{-}Ca}$ и реакцией на растяжение.

На рис. 11.56 показан эффект локального сдавливания кардиомиоцита, лежащего на широкой стороне (broad-wise position) и находящегося в перфузионной среде, содержащей стандартную концентрацию ионов K^+. В patch-пипетке также находятся ионы K^+. Другими словами, созданы условия $[K^+]_{in}/[K^+]_{out}$. Компрессия гиперполяризует клетку от −75 до −80 мВ. Когда сдавливание прилагалось к клетке, лежащей на широкой стороне, это увеличило I_{K1}, однако можно было предположить и инактивацию I_{PA} через неселективные катионные каналы.

Таким образом, сдавливание клетки, лежащей на широкой стороне (broad-wise position), с $[K^+]_{in}/[K^+]_{out}$-растворами увеличивало I_{K1}. Также была возможна инактивация фонового I_{NS}. Сжатие не уменьшало I_{Ca}.

Когда изучали клетки, лежащие на широкой стороне (broad-wise position) с блокированным K^+-током, локальное сжатие на

4 мкм уменьшало поздний ток I_L. Это могла быть инактивация I_{NS} (рис. 11.57, *а*), однако растяжение на 4 мкм той же самой клетки во всех случаях вызывает появление I_{SAC} через неселективные катионные каналы (рис. 11.57, *б*). После локального сжатия клетки на 4 мкм кривая позднего тока I_L занимает позицию, которую трудно объяснить. Более сильное сжатие не приводит к изменениям кривой I_L. Если к клетке приложить меньшее сжатие — до 2 мкм, будет зарегистрировано типичное уменьшение позднего тока (рис. 11.57, *в*). Однако добавление гадолиния приводит к тому, что кривая занимает ту же самую позицию как при сжатии 4 мкм (см. рис. 11.57, *в*).

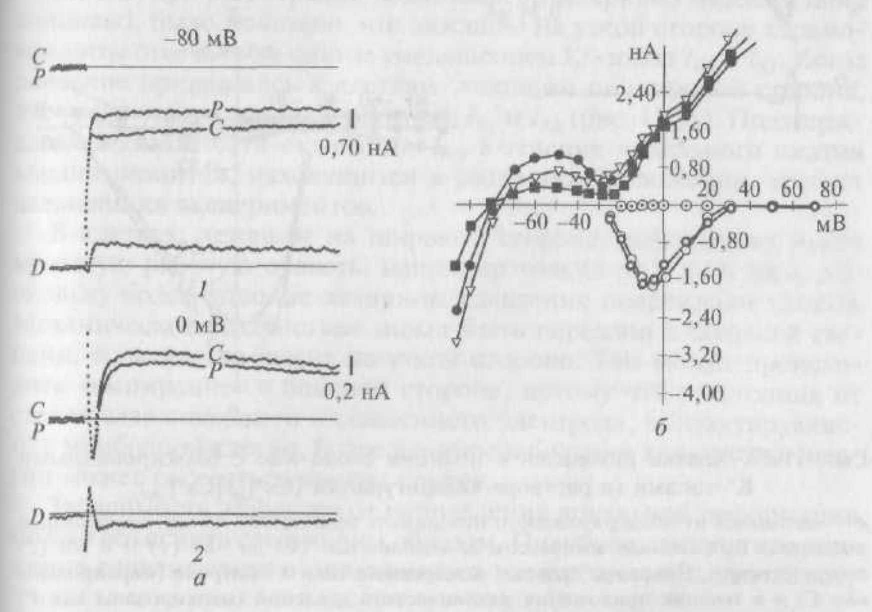


Рис. 11.56. Давление на клетку, развиваемое оплавленной пипеткой при ее смещении на 6 мкм. Клетка находится в позиции broad-wise в конфигурации растворов $[K^+]_{in}/[K^+]_{out}$:

а — начинаясь от поддерживаемого потенциала величиной –45 мВ, мембранный потенциал был смещен импульсом длительностью 140 мс до –80 (*1*) и 0 мВ (*2*) соответственно. Показаны базовые мембранные токи в контроле (маркированы как *C*) и в течение приложения механического давления (маркированы как *P*), а также дифференциальные токи, вызванные сжатием клетки (маркированы как *D*). Обратите внимание, что активированный сжатием ток более позитивен, чем ток перед сжатием при потенциалах –80 мВ, но более негативен при 0 мВ; *б* — *I*–*V*-кривые поздних токов I_L, измеренных в конце тестирующего импульса (пустые треугольники — перед сжатием; заполненные кружки — в течение сжатия на 4 мкм; заполненные квадраты — в течение сжатия на 4 мкм после аппликации Gd^{3+}). Обратите внимание, что никаких изменений $I_{Ca\text{-}L}$ не было (пустые кружки перед сжатием, пустые полужирные кружки на фоне сжатия). Гадолиний блокирует $I_{Ca\text{-}L}$ (белые кружки с точкой)

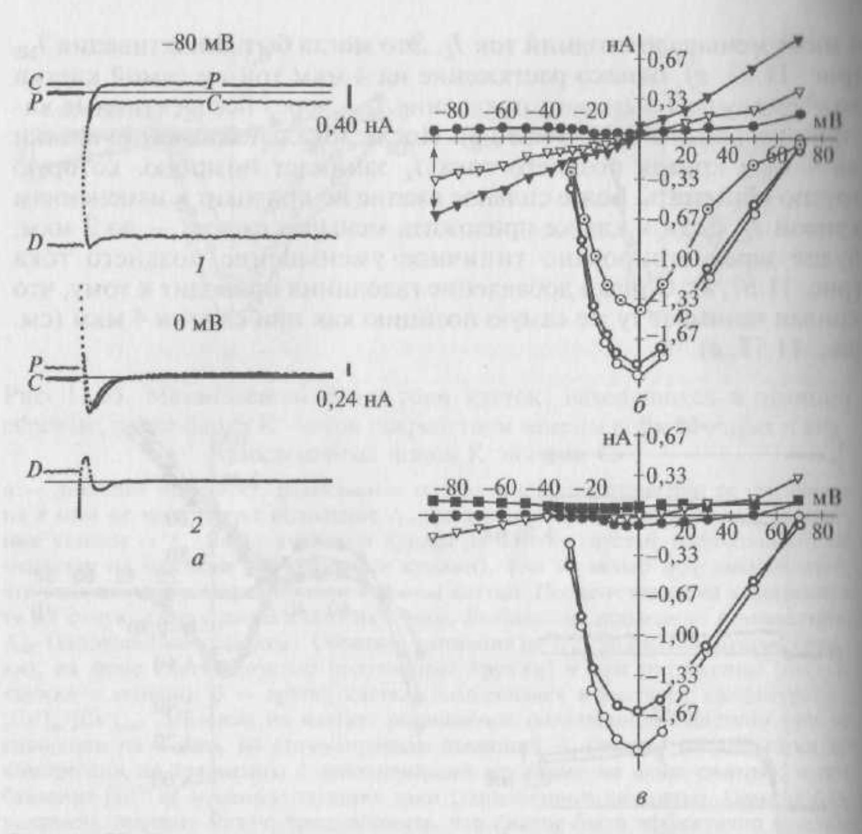


Рис. 11.57. Клетка находится в позиции broad-wise с блокированными K^+-токами (в растворе конфигурации $[Cs^+]_{in}/[Cs^+]_{out}$):

а — начинаясь от поддерживаемого потенциала величиной –45 мВ, мембранный потенциал был смещен импульсом длительностью 140 до –80 (*1*) и 0 мВ (*2*) соответственно. Показаны базовые мембранные токи в контроле (маркированы как *C*) и в течение приложения механического давления (маркированы как *P*) и дифференциальные токи, вызванные сжатием клетки (маркированы как *D*); *б* — давление на клетку, развиваемое оплавленной пипеткой, при ее смещении на 4 мкм не индуцирует появление I_{PA}, например через неселективные катионные каналы — I_{ns} (пустые треугольники перед сжатием по сравнению с заполненными кружками в течение сжатия) и устраняет входящую компоненту позднего тока I_L. Следующее за компрессией растяжение клетки на 4 мкм демонстрирует появление I_{SAC} (заполненные треугольники). Обратите внимание на $I_{Ca\text{-}L}$ до сжатия (пустые кружки), в течение сжатия (пустые полужирные кружки) и в течение растяжения (пустые кружки с точкой); *в* — сжатие на 2 мкм сдвигает I_L (пустые треугольники до сжатия по сравнению с заполненными кружками на фоне сжатия) в положительное направление. Добавление Gd^{3+} на фоне сжатия (заполненные квадраты)

Давление на внешнюю поверхность клетки может изменять несколько ионных токов. Известно, например, что некоторые МСК активируются, когда сила давления направлена в сторону ядра

клетки. Эти данные были опубликованы применительно к глиальным клеткам, клеткам гладких мышц и эндотелиальным клеткам.

Результаты экспериментов позволяют предположить, что сжатие модулирует K^+-каналы аномального выпрямления с током входящего направления. Активизирована ли проводимость или инактивирована — зависит от ориентации сжатия по отношению к длинному или короткому диаметру клетки. Сжатие клетки вызывает различные эффекты, которые зависят от угла силы сжатия, направленной по отношению к ширине и высоте клетки (т.е. клетки, находящейся в edgewise position или broad-wise position).

Позже, при регистрации вольт-амперных кривых методом ramp command, было показано, что лежащие на узкой стороне кардиомиоциты отвечали на сжатие уменьшением K^+-токов I_{K0} и I_{K1}. Когда давление прилагалось к клеткам, лежащим на широкой стороне, это увеличивало два калиевых тока I_{K1} и I_{K0} (рис. 11.58). Подтверждение возможности активации I_{NS} в течение локального сжатия кардиомиоцитов, находящихся в различном положении, требует дальнейших экспериментов.

В клетках, лежащих на широкой стороне, деформация имеет меньшую рабочую область, например только от 0 до 6 мкм, поскольку более высокие величины сдавления повреждают клетки. Механическое воздействие может быть передано в большей степени, если клетка лежит на узкой стороне. Там может происходить «выпирание» в боковой стороне, потому что расстояние от стекла сдавливающего оплавленного электрода, контактирующего с мембраной клетки, более длинное и большее количество энергии может рассеяться внутри клетки.

Зависимость эффектов от направления локальной деформации можно объяснить следующим образом. Подобное стандартное движение сдавливающего оплавленного электрода уменьшит высоту

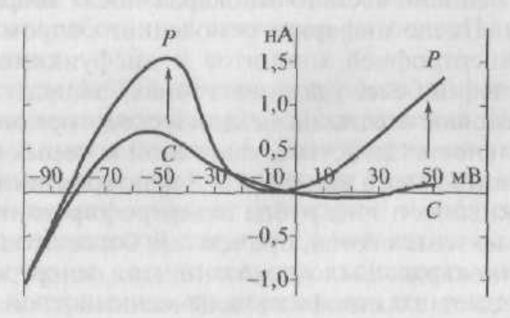


Рис. 11.58. Токи до и на фоне сжатия клетки на 3 мкм, когда клетка находится в позиции broad-wise. Обратите внимание, что гиперполяризация замечена как сдвиг потенциала от −80 до −84 мВ при нулевом токе: *C* — контроль; *P* — приложение механического давления

клеток, лежащих на широкой стороне, больше, чем у клеток, лежащих на узкой стороне, однако это увеличит локальный диаметр больше в edgewise position, чем в broad-wise position.

Асимметрию ответа трудно объяснить известными моделями, которые описывают gating канала в терминах tension поверхностного липидного бислоя. Объяснить эти феномены проще, если принять за условие, что энергия локального сжатия передана белку канала элементами цитоскелета.

Обработка клеток цитохалазином D, который, как полагают, разрушает F-актин, уменьшила амплитуду I_{SAC} на фоне непрерывного растяжения. Это уменьшало активацию I_{K1} при приложении давления к клетке, лежащей в положении broad-wise. Когда клетки были предобработаны перед приложением растяжения, механочувствительность была уменьшена или устранена, т.е. механические стимулы (растяжение или давление) стали неэффективными. Почти идентичные результаты были получены при внутриклеточном диализе 5 мкмоль/л колхицина, т.е. деполимеризация тубулина уменьшала или устраняла механосенситивные I_{NS} и I_{K1}. Из этих наблюдений мы заключили, что неповрежденный цитоскелет необходим *для* работы МСК и воротного механизма K^+-каналов. Мы могли бы видеть цитоскелет как часть пути, который преобразует экзогенную механическую энергию в энергию активации мембранных каналов. Эта гипотеза находится в соответствии с увеличенной механосенситивностью и I_{NS} в гипертрофированных клетках с патологически высокой экспрессией тубулина в цитоскелетном кортексе.

Исследования кардиомиоцитов в ткани желудочков с патологией сердца. После инфаркта миокарда увеличенная нагрузка на ткань, не затронутую рубцом, может инициировать работу МСК и таким образом вызывать аритмии из-за электрической нестабильности вентрикулярных миоцитов.

Свойства неишемического миокарда после инфаркта обычно неоднородны. После инфаркта ремоделинг сопровождается значительной гипертрофией миоцитов и дисфункцией смежных с рубцом областей. В более удаленных зонах наблюдаются характерные и комплексные ответы на механическое, гормональное и/или нейрогуморальное воздействие, причиной которых является процесс ремоделинга левого желудочка. Характеристики потенциалов действия выживших в зоне рубца гипертрофированных миоцитов принципиально изменяются, причем они более неоднородны, чем в здоровом миокарде. Было показано, что гипертрофированный миокард обладает электрофизиологическими свойствами, делающими его более чувствительным к аритмиям, чем нормальная ткань.

Патофизиологический статус измененных характеристик потенциала действия, связанных с работой SAC в сердечной ткани,

после инфаркта миокарда требовал изучения. Поскольку известно, что изменения в нагрузке могут вызывать аритмию, которая возникает в поврежденных рубцом сердцах, возможно, из-за усиления процессов механоэлектрической обратной связи, мы предлагаем следующую концепцию. Во-первых, механоэлектрическая обратная связь работает не только в неповрежденном миокарде, но также и в постинфарктной сердечной ткани. Во-вторых, эта обратная связь увеличена в постинфарктном миокарде по сравнению с нормальной сердечной мышцей, и, наконец, механоэлектрическая обратная связь вызывает электрофизиологические изменения по типу аритмий, которые определяются работой МСК.

Для подтверждения этой точки зрения был необходим анализ влияния механического растяжения ткани на внутриклеточные электрофизиологические характеристики вентрикулярных миоцитов в препаратах от здоровых животных и животных, перенесших инфаркт миокарда левого желудочка. Эти исследования были проведены относительно недавно на крысах.

Предрастяжение ткани было таковым, чтобы обеспечить устойчивое развитие active force 0,5 мН. Для того чтобы смоделировать изменения по типу диастолического внутрисердечного давления/объема в патологических состояниях, использовали установившееся диастолическое растяжение, т. е. изменение длины ткани. Разумеется, степень растяжения, которому были подвергнуты отдельные клетки ткани, различна, однако эта ситуация сопоставима с изученной in situ.

Инфаркт миокарда у крыс был вызван перевязыванием левой коронарной артерии. Для экспериментов использовали сердца, имеющие зону инфаркта в левом желудочке величиной (16,5 ± 0,6) %. Авторы использовали стандартный срез левого желудочка 8 × 4 мм, состоящий на 50 % из рубцовой и на 50 % из прилегающей нерубцовой ткани. Были исследованы кардиомиоциты, расположенные рядом с рубцовой тканью. Для сравнения в опытах с контрольными животными работали с клетками из сопоставимой области левого желудочка.

Приблизительно 90 % препаратов после инфаркта миокарда демонстрировали самопроизвольное сокращение. Для того чтобы изучить вызванные растяжением электрофизиологические явления при сравнимых экспериментальных условиях, из группы животных, перенесших инфаркт миокарда, использовали только препараты со спонтанной сократительной активностью. В связи с тем что спонтанная сократительная активность никогда не наблюдалась в контрольных препаратах, их стимулировали прямоугольными импульсами электрического тока с частотой 0,5 Гц, которая была сопоставима с диапазоном самопроизвольной частоты сокращения фрагмента ткани от животных, перенесших инфаркт миокарда. Эксперименты заключались в шаговом растяже-

нии и релаксации вентрикулярной ткани при одновременной регистрации микроэлектродной техникой биоэлектрических параметров клеток.

Примеры потенциалов действия, зарегистрированных на фоне предрастяжения препарата, от вентрикулярной ткани контрольных животных и животных, перенесших инфаркт миокарда, изображены на рис. 11.59. Величина предрастяжения была такой, чтобы получить уровень active force 0,5 мН в обеих группах. Было показано, что в течение экспериментального протокола в отсутствие любых изменений в предрастяжении форма потенциалов действия остается устойчивой.

Результат постинфарктного ремоделинга заключается в изменениях характеристик потенциалов действия вентрикулярных кардиомиоцитов по сравнению с контрольной группой. Кардиомиоциты после инфаркта миокарда имели сопоставимую амплитуду потенциалов действия, более отрицательный потенциал покоя ((–95,2 ± 1,3) мВ по сравнению с (–88,6 ± 0,8) мВ) и в среднем бóльшую длительность потенциала действия на уровне 90 % фазы реполяризации (APD90: (129 ± 15) мВ по сравнению с (86 ± 3) мВ по сравнению с контрольными животными. После инфаркта миокарда по сравнению с контрольной группой большие величины разброса в большем числе экспериментов могли бы отражать увеличение гетерогенности потенциала действия в желудочковом фрагменте миокарда с рубцовой тканью (рис. 1.59, *б*).

Ремоделинг после инфаркта миокарда ассоциируется с фенотипическими изменениями и развитием гипертрофии в незатронутом рубцом миокарде. Было показано увеличение площади поперечного сечения и длины кардиомиоцитов левого желудочка. Гипертрофия выражается в удлинении APD и увеличении дисперсии в APD.

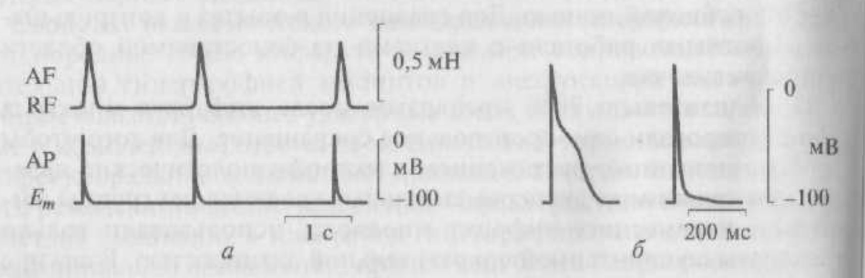


Рис. 11.59. Длительная регистрация силы сокращений препарата левого желудочка и потенциалов действия (AP) от этого препарата у животных, перенесших инфаркт миокарда левого желудочка:

а — верхняя кривая — регистрация силы сокращения препарата, нижняя кривая — регистрация биоэлектрической активности клетки; *б* — одиночные потенциалы действия кардиомиоцитов животного, перенесшего инфаркт миокарда

В группе животных, перенесших инфаркт миокарда, растяжение только на 20 мкм увеличивает active force от 0,50 до 0,57 мН. Эффективное растяжение миофиламентов будет различно для контрольных и инфарктных тканей. Значительное растяжение ткани контрольной группы и незначительное растяжение в ткани после инфаркта миокарда вызывают более чем двукратное увеличение в APD90. Эти эффекты полностью обратимы после снятия растяжения. В представленных экспериментах показано, что потенциал покоя клетки, так же как и амплитуда потенциала действия, не зависят от величины растяжения.

В отличие от контрольной группы, где высокая степень растяжения увеличила active force на 80 %, что вызывало появление SID, у кардиомиоцитов в группе после инфаркта миокарда слабое растяжение, которое увеличило active force только на ~15 %, также вызывало SID. Несмотря на явно выраженное увеличение active force при растяжении препарата, в этих экспериментах невозможно точно оценивать степень растяжения, воздействующего на мембрану отдельных клеток, так как неизвестно влияние этого растяжения на периодичность саркомеров.

В здоровых сердцах конфигурация потенциала действия различных кардиомиоцитов эндокардиальной области желудочка, где обычно возникал инфаркт, была относительно неизменна. После инфаркта миокарда в процессе ремоделинга наблюдали выраженную гетерогенность потенциалов действия кардиомиоцитов той же области сердца (разумеется, не в зоне самого рубца). Показано, что у крыс после инфаркта миокарда при ремоделинге продолжительность потенциала действия увеличена прежде всего за счет времени реполяризации. Различное время реполяризации потенциала действия свидетельствует о неоднородности миоцитов левого желудочка крыс. Увеличение APD объясняли уменьшением выходящего K^+-тока, скорее чем изменениями входящих Ca^{2+}-токов. Электрофизиологическая неоднородность может быть следствием различий в процессе ремоделинга между отдельными клетками.

Непосредственно рубец, так же как и смежный с ним миокард, намного более стоек к растяжению. То, что в сердцах после инфаркта механические силы деформируют несокращающийся регион рубца, известно достаточно давно. Это различное действие сил на некротический и здоровый миокард имеет большое значение для наблюдаемой электрофизиологической неоднородности в рубце.

Гиперполяризация мембраны кардиомиоцитов в сердцах после инфаркта по сравнению с контрольными сердцами должна быть связана с увеличением амплитуды потенциала действия, которую мы не наблюдали. Эти результаты свидетельствуют о возможном уменьшении входящего Na^+-тока в кардиомиоцитах, расположен-

ных в пограничной с рубцом зоне левого желудочка, как сообщено для инфаркта сердец кролика.

Как показано на рис. 11.59, *б*, после инфаркта миокарда в пограничной с рубцом ткани левого желудочка регистрировали AP различной длительности. В случаях потенциалов действия с небольшой длительностью SID появляется на уровне APD90 (рис. 11.60). При такой же степени растяжения в случаях длительных потенциалов действия SID появляется на уровне APD50 (рис. 11.61).

Зависимость между возникновением механоиндуцированным SID на уровне APD50 или APD90 и степенью растяжения ткани показана для группы животных, перенесших инфаркт миокарда. Даже крайне малое растяжение препарата, выражающееся в незначительном увеличении active force, вело к появлению SID большой амплитуды. В целом увеличение APD50 или APD90 после растяжения происходило из-за развития SID. Шаговое уменьшение растяжения демонстрировало полную обратимость изменений в конфигурации потенциалов действия, а полная релаксация препарата приводила к устранению SID.

В контрольных сердцах длительное растяжение вело к увеличению в APD90 за счет появления SID. В отличие от «классической» ранней или задержанной автодеполяризации наблюдаемая SID не

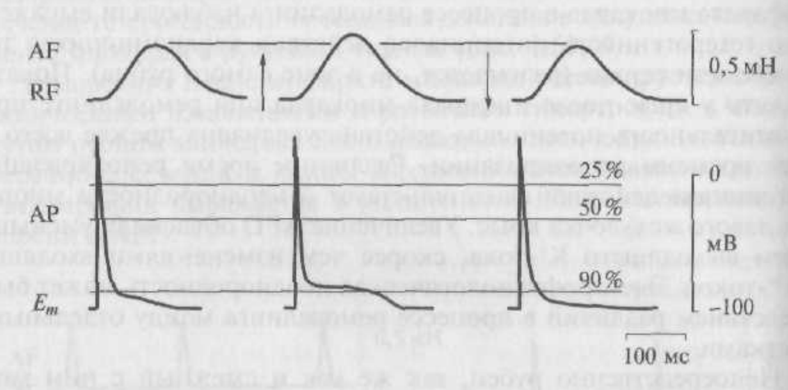


Рис. 11.60. Механоиндуцированная деполяризация (SID) на уровне APD90 клетки левого желудочка крысы после инфаркта миокарда левого желудочка. Небольшая величина растяжения препарата, вызывающая незначительное увеличение active force (от (0,5 ± 0,004) до (0,57 ± 0,008) мН), ведет к возникновению SID, а возвращение к исходному уровню растяжения ткани приводит к возвращению потенциалов к исходному состоянию:

верхняя кривая — регистрация силы сокращения препарата, нижняя кривая — регистрация биоэлектрической активности клетки; символ (↑) — моменты растяжения препарата; символ (↓) — момент возвращения величины растяжения препарата к исходному уровню; AF — active force; RF — resting force; E_m — величина потенциала покоя; AP — потенциал действия

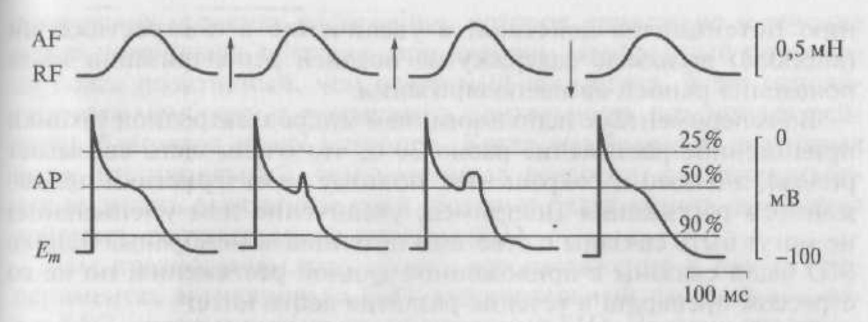


Рис. 11.61. Механоиндуцированная деполяризация (SID) на уровне APD50 клетки левого желудочка крысы после инфаркта миокарда левого желудочка. Небольшая величина растяжения препарата, вызывающая незначительное увеличение active force (от $(0{,}5 \pm 0{,}004)$ до $(0{,}57 \pm 0{,}008)$ мН) ведет к возникновению SID, а возвращение к исходному уровню растяжения ткани приводит к возвращению потенциалов к исходному состоянию:

верхняя кривая — регистрация силы сокращения препарата, нижняя кривая — регистрация биоэлектрической активности клетки; символ (↑) — моменты растяжения препарата; символ (↓) — момент возвращения величины растяжения препарата к исходному уровню; AF — active force; RF — resting force; E_m — величина потенциала покоя; AP — потенциал действия

зависела от запуска предшествующего потенциала действия. После инфаркта миокарда более низкая степень растяжения, определяемая существенно меньшим увеличением в active force в сравнении с контрольными сердцами, индуцирует SID в гетерогенных потенциалах действия около APD50 или APD90. В отличие от предсердного препарата в вентрикулярной ткани SID не приводила к аритмии. Однако возникновение механоиндуцированной аритмии недавно демонстрировали в экспериментах на препаратах здоровых сердец и вентрикулярных препаратах. Было показано, что генерация механоиндуцированной аритмии находилась в зависимости от скорости и интенсивности механического задающего сигнала.

Было установлено, что растяжение может уменьшать или увеличивать конфигурацию потенциалов действия либо не воздействовать на нее. Это зависит от продолжительности и синхронизации механического задающего раздражения. Механоиндуцированные изменения в конфигурации потенциалов действия могут быть внешне похожи на раннюю или задержанную автодеполяризацию в зависимости от того, применяется ли экспериментальное растяжение в поздний период систолы или ранний период диастолы. Показано, что степень растяжения ткани более важна для ответа мембранного потенциала, чем его продолжительность. Показано, что увеличенное предрастяжение (preload) приводило к укороче-

нию потенциалов действия, а увеличение в пострастяжении (afterload) вызывало задержку на поздней реполяризации из-за появления ранней автодеполяризации.

В экспериментах с использованием микроэлектродной техники приложенное растяжение равно 30 с, что очень тесто связывает preload, afterload и сокращения, поэтому характеристики приложенного растяжения (например, увеличение или уменьшение) не могут быть связаны с ответами потенциала мембраны. Однако SID были связаны с приложенной длиной растяжения, но не со стрессом препарата в течение развития active force.

Наиболее существенный результат микроэлектродного исследования ткани от контрольных крыс и крыс, перенесших инфаркт миокарда, заключается в том, что в ткани, подверженной ремоделингу, растяжение выявляло SID с большей готовностью, чем в препаратах от контрольных животных. В группе животных, перенесших инфаркт миокарда, повышенная чувствительность к растяжению, вероятно, не связана с жесткостью рубцовой ткани, потому что более низкие изменения длины были связаны с пропорционально низким увеличением active force по сравнению с контролем. Увеличенная чувствительность мембранного потенциала к растяжению может быть результатом взаимодействия с окружающими клетками, например фибробластами в ткани, и/или результатом изменения мембранных свойств отдельного кардиомиоцита.

В результате после инфаркта миокарда SID возникает у клеток в зоне, пограничной к инфарктной области при более низких степенях растяжения, что может иметь более высокую степень риска при желудочковой аритмии после инфаркта.

Как и в кардиомиоцитах контрольных животных, так и у вентрикулярных клеток от ткани после инфаркта миокарда Gd^{3+} ингибирует SID. На уровне APD90 SID была полностью подавлена через 10 мин после аппликации 40 мкмоль/л Gd^{3+}. Аналогичный эффект ингибирования SID наблюдали в ткани после инфаркта миокарда на уровне APD50. Увеличение концентрации Gd^{3+} до 80 мкмоль/л в обоих случаях приводит к описанному эффекту уже через 5 мин. Гадолиний не оказывает влияния на потенциал покоя, амплитуду потенциала действия и частоту самопроизвольных сокращений, что было уже отмечено в экспериментах с контрольной группой, в которой SID появляются практически всегда на уровне APD90. Гадолиний является признанным блокатором SAC, которые зарегистрированы в сердечных клетках.

Потенциал реверсии механосенситивных токов в кардиальных клетках лежал в диапазоне от –15 до –18 мВ. Установлено, что реверсный потенциал обусловлен главным образом Na^{+}-, K^{+}-, Ca^{2+}-токами и лежит в пределах –40 мВ. Миокардиальные SAC могут проводить как входящие, так и выходящие токи. При физио-

логических условиях растяжение, которое приложено в течение плато потенциала действия, при котором мембранный потенциал более позитивный, чем реверсный потенциал, будет реполяризовать мембрану и укорачивать длительность потенциала действия благодаря входу катионов. Когда мембранный потенциал более отрицательный, чем потенциал реверсии, растяжение будет вызывать выходящие токи, которые будут менять потенциал действия, соответственно вызывая SID.

Мы предполагаем, что длительное растяжение в наших экспериментах активировало Gd^{3+}-чувствительный входной ток через SAC, которые вызывали наблюдаемый SID. Недавно представленная математическая модель, включающая SAC, частично предсказала электрофизиологические аномалии, которые наблюдали в этих экспериментах. Эти электрофизиологические аномалии были чувствительны к Gd^{3+}, что достаточно строго подтверждает вовлечение SAC. Должно быть отмечено, что Gd^{3+} в дополнение к блокированию SAC ингибирует потенциалзависимые Ca^{2+}-каналы в изолированных желудочковых миоцитах морской свинки. Показано, что Gd^{3+}, но не органические ингибиторы Ca^{2+}-каналов блокировали механоиндуцированные электрофизиологические аномалии в изолированном миокарде кролика. Так как в наших экспериментах 40 М Gd^{3+} не воздействовали на плато потенциала действия и сократительную функцию препаратов, хотя одновременно блокировали SID, ингибирование потенциалзависимых Ca^{2+}-каналов при помощи Gd^{3+} кажется маловероятным, чтобы объяснить наши результаты. Кроме того, после введения Gd^{3+} временная задержка в наблюдаемых эффектах была намного меньше при 80 мкмоль/л, чем при 40 мкмоль/л Gd^{3+}, поэтому возможно, что ограниченная диффузия в препаратах уменьшила эффективную концентрацию Gd^{3+} к уровню, который был слишком низким, чтобы блокировать потенциалсенситивные Ca^{2+}-каналы. Задержанный негативный инотропный эффект Gd^{3+} мог бы появиться, когда вещество достигло определенных концентраций после диффузии. Мы поэтому предполагаем, что подавление SID Gd^{3+} в наших экспериментах происходило из-за ингибирования SAC в большей степени, чем блокада потенциалзависимых Ca^{2+}-каналов.

В ранних экспериментах наблюдаемая автодеполяризация обсуждалась как артефакт движения электрода, однако затем было строго доказано, что это истинный ответ мембраны на растяжение. Появление SID связано с МСК, что предполагали многие исследователи у различных здоровых животных.

Исследования изолированных кардиомиоцитов желудочков с патологией сердца. *Модуляция потенциала покоя и потенциала действия.* Изолированные кадиомиоциты желудочков сердца человека, перенесшего инфаркт миокарда, отвечают на растяжение подобно кардиомиоцитам морской свинки, однако чтобы получить

сравнимые изменения в потенциале покоя и потенциале действия, механические стимулы для кардиомиоцитов больного человека должны быть в 2 или 4 раза меньше, чем у здоровой морской свинки. Эта повышенная сенситивность изолированных кардиомиоцитов больного сердца к растяжению совпадает с данными, полученными при помощи микроэлектродного отведения от фрагментов ткани сердца животных после инфаркта миокарда. Растяжение изолированной клетки только на 2 мкм деполяризует ее на (10 ± 3) мВ. Кроме того, APD90, равная (341 ± 15) мс до растяжения клетки, возрастает до (571 ± 68) мс при растяжении ее на 2 мкмоль/л. Растяжение ускоряет реполяризацию в течение начальной фазы 1 потенциала действия, но удлиняет реполяризацию в течение поздней фазы 2.

Важнейшим достижением приведенных работ являются данные о повышении чувствительности к растяжению у гипертрофированных клеток. Эти экспериментальные данные, выполненные на изолированных кардиомиоцитах, полностью подтверждают предшествующие публикации о повышении чувствительности клеток гипертрофированной ткани предсердий и желудочков к ее растяжению.

Модуляция механосенситивных токов. При регистрации тока, активируемого растяжением, было показано, что растяжение клетки от исходного уровня до конечных значений (например, до 10 мкм) длилось только 200 мс, и это время определялось частотой шагов шагового двигателя на микроманипуляторе. Активация I_{SAC} (на уровне −45 мВ) наблюдалась в течение 200 мс, т. е. процесса растяжения (аналогичные результаты были получены на кардиомиоцитах от сердец больных людей, морских свинок и крыс). Быстрая активация I_{SAC} подтверждает раннее сообщение, в котором оба конца вентрикулярных миоцитов от здоровых крыс были растянуты. У растянутой до определенного значения клетки I_{SAC} (на уровне −45 мВ) был постоянным в течение нескольких минут, т. е. инактивация или адаптация не наблюдалась.

Отсутствие инактивации в течение длительного растяжения было и у вентрикулярных кардиомиоцитов человека после инфаркта миокарда, и у вентрикулярных кардиомиоцитов здоровой морской свинки, и у вентрикулярных кардиомиоцитов здоровых и гипертензивных крыс.

Отсутствие инактивации или адаптации I_{SAC} в перечисленных экспериментах совпадает с предварительными результатами, полученными на клетках из предсердия и желудочков крыс.

Зависимость механочувствительности кардиомиоцитов от возраста животных и наличия у них гипертензии. У изолированных кардиомиоцитов амплитуда I_{SAC} нарастала с увеличением растяжения клеток. У больных людей с подавленными калиевыми токами и при поддерживаемом потенциале −45 мВ, растяжение кар-

диомиоцита на 2 мкм вызывало I_{SAC}, равный (−116±25) пА, а растяжение клетки на 4 мкм вызывало I_{SAC}, равный (−483±28) пА (рис. 11.62).

У кардиомиоцитов здоровых морских свинок при поддерживаемом потенциале −45 мВ I_{SAC} вообще не возникал при растяжении на 2 мкм. При растяжении клеток на 4 мкм только 2 из 19 дали реакцию в виде появления I_{SAC}, равного (−65 ± 21) пА. При дальнейшем увеличении степени растяжения I_{SAC} реагировали у всех

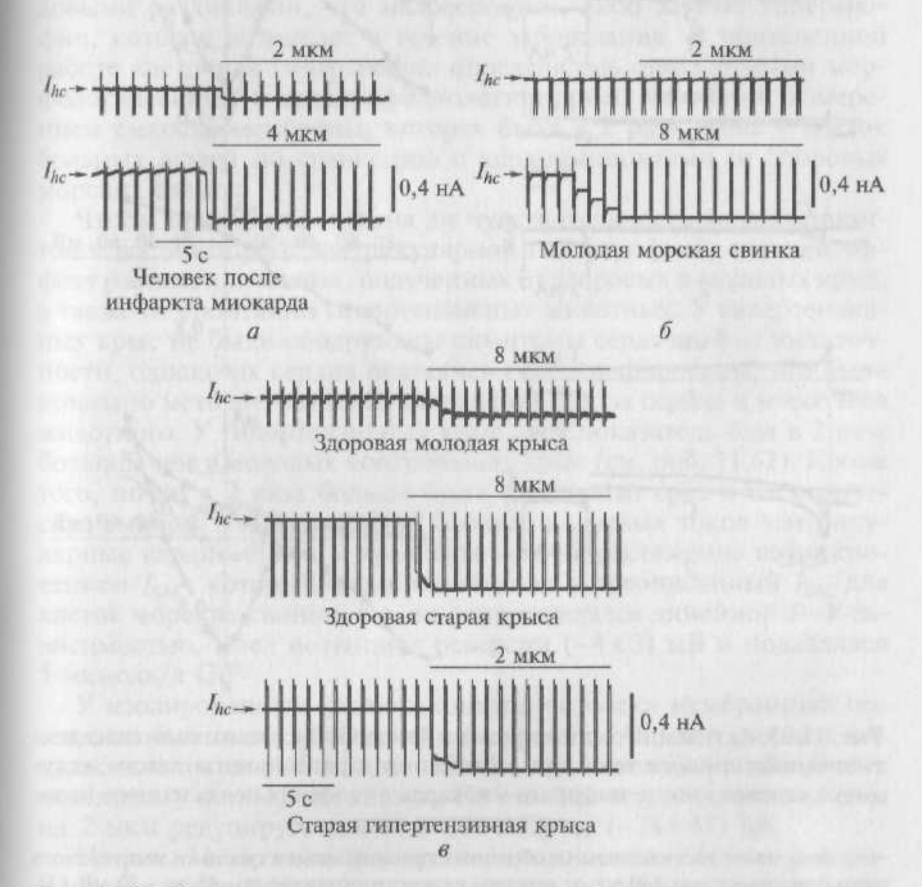


Рис. 11.62. Оригинальные кривые зарегистрированного тока до растяжения и при растяжении кардиомиоцитов, полученные на самописце; I_K подавлен:

а — кардиомиоциты желудочка сердца человека после инфаркта миокарда; *б* — кардиомиоциты желудочка сердца морской свинки возрастом 3 мес; *в* — кардиомиоциты желудочка сердца крысы: верхняя кривая — здоровая крыса (3 мес); средняя кривая — здоровая крыса (15 мес); нижняя кривая — гипертензивная крыса (15 мес). На каждой кривой растяжение клетки с указанием степени растяжения отмаркировано линией сверху

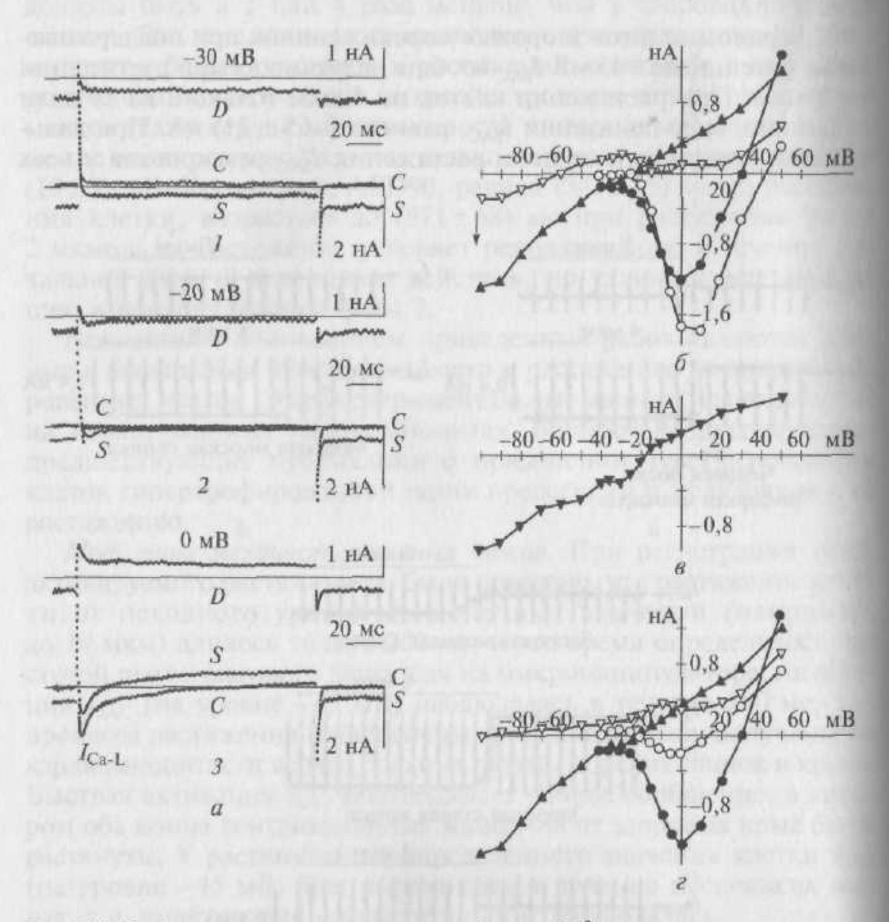


Рис. 11.63. Активация растяжением на 4 мкм Gd^{3+}-сенситивного неселективного катионного тока при растяжении кардиомиоцита левого желудочка человека после инфаркта миокарда в условиях подавленного цезием калиевого тока:

а — модуляция растяжением мембранных токов на фоне ступеньки импульсного тока длительностью 140 мс от поддерживаемого потенциала –45 до –30 мВ (*1*), –20 (*2*) и 0 мВ (*3*); *б* — *I*—*V*-кривые поздних токов, измеренных в конце 140 мс импульса (I_L отмечены треугольниками), и *I*—*V*-кривые, характеризующие работу L-типа Ca^{2+}-каналов ($I_{Ca\text{-}L}$ отмечены кружками). Вольт-амперные кривые мембранных токов до растяжения отмечены пустыми символами, а на фоне растяжения клетки на 4 мкм — заполненными; *в* — растяжение клетки индуцирует дифференциальный ток, характеризующийся линейной *I*—*V*-кривой и потенциалом реверсии, равным –16 мВ; *г* — механоиндуцированный поздний (треугольники) и входящий $I_{Ca\text{-}L}$ ток (кружки) до (заполненные символы) и после (пустые символы) добавления в перфузионный раствор 5 мкмоль/л Gd^{3+}

исследуемых клеток. На растяжение величиной 6 мкм клетки отвечали возникновением I_{SAC} величиной (–300 ± 89) пА, при растяжении на 8 мкм I_{SAC} был равен (–557 ± 78) пА, а при растяжении на 10 мкм I_{SAC} — (–1 050 ± 190) пА (см. рис. 11.62).

Таким образом, кардиомиоциты больных людей имели несравнимо бóльшую чувствительность к растяжению, чем кардиомиоциты здоровых морских свинок. Высокая чувствительность к растяжению клеток больных людей может быть объяснена либо видовыми различиями, что маловероятно, либо за счет гипертрофии, которая возникает в течение заболевания. В приведенной работе клеточная гипертрофия определялась стандартными морфологическими и электрофизиологическими методами, измерением емкости мембраны, которая была в 2 раза выше у клеток больных людей по сравнению с кардиомиоцитами от здоровых морских свинок.

Чтобы проверить, связана ли чувствительность кардиомиоцитов к растяжению с вентрикулярной гипертрофией, изучали эффект растяжения клеток, полученных от здоровых и молодых крыс, а также от спонтанно гипертензивных животных. У гипертензивных крыс не были обнаружены симптомы сердечной недостаточности, однако их сердца оказались гипертрофированы, что было показано методом изучения отношения массы сердца к массе тела животного. У гипертензивных крыс этот показатель был в 2 раза больше, чем у молодых контрольных крыс (см. рис. 11.62). Кроме того, почти в 2 раза больше были клеточный срез и электрическая емкость мембраны. При блокаде калиевых токов вентрикулярные кардиомиоциты крыс отвечали на растяжение возникновением I_{SAC}, который очень напоминал вышеописанный I_{SAC} для клеток морских свинок, т. е. он сопровождался линейной *I—V*-зависимостью, имел потенциал реверсии (–4 ± 3) мВ и подавлялся 5 мкмоль/л Gd^{3+}.

У изолированных кардиомиоцитов человека мембранный потенциал был также фиксирован на уровне –45 мВ и смещен импульсным током (140 мс) до –70 мВ, т. е. до величины, близкой к потенциалу покоя этих клеток. На этом фоне растяжение клетки на 2 мкм редуцирует ток от (+126 ± 32) до (–28 ± 41) пА.

На рис. 11.63, *а* на примере кардиомиоцита человека с выраженной гипертрофией сердца показана модуляция растяжением мембранных токов в течение 140 мс импульса от –45 мВ до –30, –20 и до 0 мВ. На рис. 11.63, *б* сравнены *I—V*-кривые мембранных токов до растяжения (пустые символы) с мембранными токами на фоне растяжения (заполненные символы). Растяжение клетки уменьшает $I_{Ca\text{-}L}$-ток (кружки). Более важно, что поздние токи, измеренные в конце 140 мс импульса (I_L, треугольники), были заметно изменены на фоне растяжения клетки. В этих условиях растяжение кардиомиоцитов человека на 4 мкм вызывало позд-

ний дифференциальный ток, который выражался как линейная I—V-кривая и пересекал V-ось координат при потенциале реверсии –16 мВ ((–11 ± 5) мВ) (рис. 11.63, *в*).

У кардиомиоцитов человека I_{SAC} во всех случаях был блокирован введением в перфузионный раствор 5 мкмоль/л Gd^{3+}. На рис. 11.63, *г* представлены типичные примеры изменения I—V-кривой кардиомиоцита человека при его растяжении (заполненные символы) и при последующем добавлении на фоне растяжения в омывающий клетку раствор 5 мкмоль/л Gd^{3+} (пустые символы). На фоне растяжения поздние токи, измеренные в отсутствие и в присутствии Gd^{3+}, пересекались при E_{rev} = (–1 ± 4) мВ. Линейная I—V-зависимость, E_{rev} = –11 мВ и Gd^{3+}-чувствительность предполагают, что I_{SAC} — это ток, который течет через неселективные катионные механосенситивные каналы.

Поздние мембранные токи под действием Gd^{3+} были слегка увеличены по сравнению с токами в отсутствие механического воздействия на клетку (сравните поздние токи, измеренные в конце 140 мс импульса и отмеченные пустыми треугольниками на рис. 11.63, *б* и *г*). Это является подтверждением ранних сообщений о Gd^{3+}-чувствительности неселективных базовых токов, описанных без глубокой детализации для миоцитов и сообщений о Gd^{3+}-чувствительности предположительно неселективных базовых токов у кардиомиоцитов предсердий и желудочков.

На рис. 11.64 и 11.65 суммированы данные по всем группам животных и человека. Растяжение кардиомиоцитов (см. рис. 11.65) желудочков молодых крыс (3 мес) на 2 и 4 мкм не приводило к появлению I_{SAC}. При дальнейшем увеличении степени растяжения клетки I_{SAC} регистрировали у всех исследованных клеток. Так, растяжение кардиомиоцита на 8 мкм индуцирует входящий ток величиной

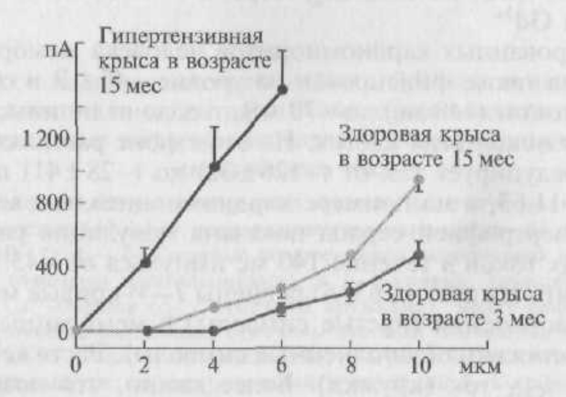


Рис. 11.64. Зависимость величины I_{SAC} от величины растяжения клетки. Показаны кардиомиоциты желудочка сердца здоровой крысы (3 мес и 15 мес) и гипертензивной крысы (15 мес)

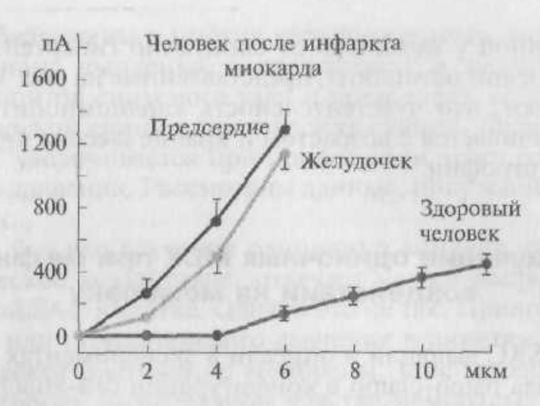


Рис. 11.65. Зависимость величины I_{SAC} от величины растяжения клетки. Показаны кардиомиоциты желудочка сердца здорового молодого человека и человека, перенесшего инфаркт миокарда, а также кардиомиоциты предсердия человека, перенесшего инфаркт миокарда

(–269±40) пА (при поддерживаемом потенциале –45 мВ). Аналогичное растяжение на 8 мкм кардиомиоцитов желудочков здоровых старых крыс (15 мес) вызывает значительно больший I_{SAC}, равный (–460±55) пА, а растяжение кардиомиоцитов желудочков старых крыс (15 мес) со спонтанной гипертензией вызывает I_{SAC}, равный (–420±110) пА уже при растяжении клетки на 2 мкм. У этих же животных растяжение клеток на 4 мкм вызывало I_{SAC}, равный (–1 205±110) пА, а на 6 мкм — I_{SAC}, равный –1 500 пА.

Чувствительность клеток к растяжению может быть оценена и с позиций наклона кривых, которые характеризуют I_{SAC} как функцию от величины растяжения клетки (см. рис. 11.64). При аппроксимации чувствительность к растяжению была оценена как скорость изменения кривой при растяжении более чем на 4 мкм (линейная регрессия). Для кардиомиоцитов крыс эта чувствительность была 77 пА/мкм у молодых (3 мес) животных и 132 пА/мкм у старых (15 мес) животных, однако она была 270 пА/мкм у кардиомиоцитов старых (15 мес) спонтанно гипертензивных крыс. Изменения показывают, что чувствительность клеток к растяжению увеличивается с гипертрофией, которая развивается в течение возраста, но сильнее с гипертензией.

Растяжение кардиомиоцитов (см. рис. 11.65) предсердий и желудочков человека, перенесшего инфаркт миокарда, на 2 и 4 мкм приводило к появлению I_{SAC}, лежащего в диапазоне –300 и –600 пА соответственно. Растяжение кардиомиоцитов на 6 мкм индуцирует входящий ток величиной около –1 200 пА. Аналогичное растяжение на 6 мкм кардиомиоцитов желудочков здоровых людей вызывает значительно меньший I_{SAC}, равный –200 пА.

Чувствительность к растяжению, определенная для клеток больных человеческих сердец, была 260 пА/мкм, что сходно с величи-

ной, полученной у миоцитов от спонтанно гипертензивных старых крыс. В целом результаты, представленные на рис. 11.64 и 11.65, демонстрируют, что чувствительность кардиомиоцитов к растяжению увеличивается с возрастом и крайне высока при вентрикулярной гипертрофии.

11.2.4. Изучение одиночных МСК при механическом воздействии на мембрану

Впервые SAC выявили и описали в экспериментах с использованием метода patch-clamp в конфигурации cell-attached на культивируемых эмбриональных скелетных мышечных клетках цыпленка Р. Гарей (R. Guharay) и Ф. Сакс в 1984 г. К настоящему вре-

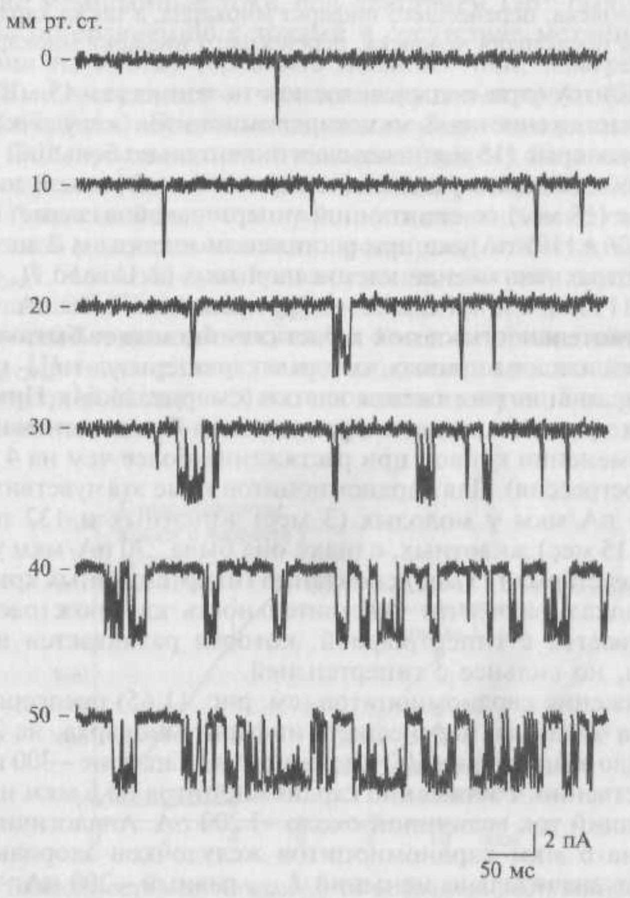


Рис. 11.66. Активируемые растяжением SAC клеток сердца. Канал активировался во время приложения негативного давления в patch-пипетку

мени они обнаружены у многих кардиомиоцитов, включая желудочки эмбриона цыпленка, в предсердиях и желудочках крыс, у кардиомиоцитов синусного узла и предсердий кроликов, в желудочках морской свинки, предсердиях свиней. Возможность открытия SAC увеличивается при приложении через patch-пипетку негативного давления. Рассмотрим данные, полученные в этих экспериментах.

Казалось бы, что изучение одиночных каналов, реагирующих на механическое воздействие, отвечает на все вопросы, связанные с работой SAC в клетке. Однако это не так. Приложение положительного или отрицательного давления в пипетку вызывает не физиологическое растяжение мембраны, а ее деформацию в ту или иную сторону на локальном участке мембраны. Кроме того, неясно, может ли открытие такого количества каналов (штук на диаметр пипетки) в пересчете на размер клетки вызвать выраженную деполяризацию и возникновение потенциала действия. Хотя косвенно, используя методы математического моделирования, это возможно рассчитать.

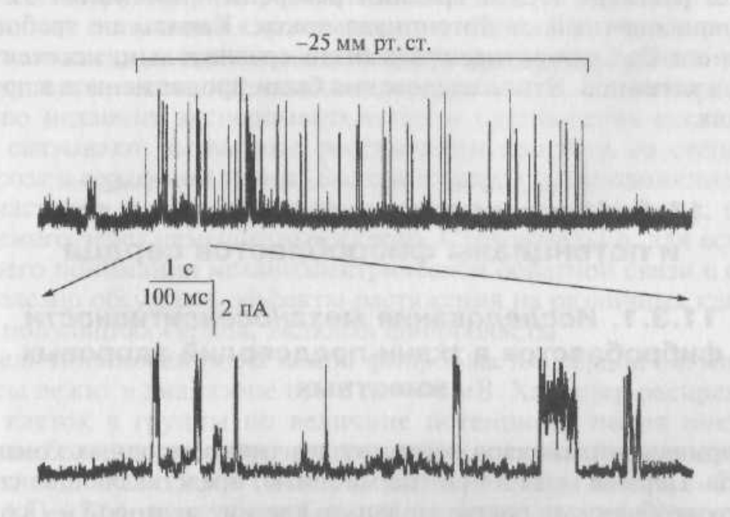


Рис. 11.67. Активируемые растяжением ионные каналы клеток сердца. Одноканальная запись активируемого растяжением ионного канала проводимостью 21 пСм у свежеизолированной клетки эмбриона цыпленка (17 сут). Сверху показаны токи до, во время и после приложения негативного давления величиной −25 мм рт. ст. к patch-пипетке. Канал активировался во время приложения негативного давления к пипетке и деактивировался при снятии давления. Внизу показано увеличение по временно́й шкале помеченного сегмента записи, показанной на верхней панели. Условия записи: пипеточный и омывающий растворы, ммоль/л: 150 NaCl, 5 KCl, 2 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 HEPES; pH 7,4 (NaOH). Поддерживаемый потенциал +60 мВ

На рис. 11.66 показана активация SAC при регистрации методом patch-clamp в конфигурации cell-attached от кардиомиоцитов. Разумеется, что речь идет не о прямом растяжении клетки, а о деформации клеточной мембраны под patch-пипеткой отрицательным давлением. Увеличение отрицательного давления увеличивает время открытия МСК. Было показано, что исследуемые SAC были сравнительно неселективны для катионов.

На рис. 11.67 продемонстрирована активация SAC с проводимостью 21 пСм при регистрации методом patch-clamp в конфигурации cell-attached от свежеизолированных вентрикулярных клеток эмбриона цыпленка. Разумеется, что речь идет не о прямом растяжении клетки, а о деформации клеточной мембраны под пипеткой отрицательным давлением –25 мм рт. ст. в пипетке.

Используя метод patch-clamp в конфигурации cell-attached, в 1988 г. В. Краелис и соавторы (W. Craelius et al.) впервые зарегистрировали SAC у вентрикулярных миоцитов неонатальных крыс, которые открывались в ответ на отрицательное давление от –1 до –6 см рт. ст. Эти каналы имели проводимость 120 пСм в изотоническом растворе KCl и средний реверсный потенциал 31 мВ, деполяризованный от потенциала покоя. Каналы не требовали внешнего Ca^{2+} для активации и были сравнительно неселективны для катионов. Эти исследования были продолжены и в других работах.

11.3. Механосенситивные каналы, токи и потенциалы фибробластов сердца

11.3.1. Исследования механосенситивности фибробластов в ткани предсердий здоровых животных

Нормальный миокард содержит два типа клеточных компартментов. Первый — те или иные миоциты, представляющие собой электровозбудимые сократительные клетки, а второй — сопутствующие немышечные клетки, которые электроневозбудимы. Последний компартмент состоит из различных клеточных типов, в том числе фибробластов. Фибробласты достаточно широко представлены в сердце. В среднем в целом сердце млекопитающих фибробластов приблизительно 5—10 % общего количества клеток. Однако их количество особенно велико в зоне синоатриального узла, где по данным разных авторов оно составляет от 45 до 75 % общего количества клеток. Хотя в сердце представлены различные немышечные клетки, фибробласты среди них доминируют. Показано, что среди всех немышечных клеток сердца их более 90 %.

Фибробласты сердца синтезируют и выделяют различные биологически активные вещества и, следовательно, принимают участие в регуляции работы сердца. Однако эти клетки играют роль и в процессах электрогенеза здорового сердца и сердца с различными патологиями. В 1986 г. А. Камкин и И. Киселева впервые опубликовали данные об электрофизиологических свойствах сердечных фибробластов в целом бьющемся сердце, изолированном сердце или его фрагментах. Более того, было описано межклеточное электротоническое взаимодействие этих клеток. Поскольку в те годы авторы еще не сделали гистологические исследования, клетки первично были названы как «атипичные» немышечные клетки сердца. Позднее в исследованиях с одновременным применением микроэлектродной техники и гистологических методов было показано, что изучаемые «атипичные» клетки сердца являются фибробластами, обладающими выраженной реакцией на механическое воздействие.

Как показано в предыдущем подразделе, большинство вызванных растяжением изменений в сердечной частоте и ритме можно объяснять прямыми эффектами механического вмешательства в различные популяции кардиомиоцитов. Однако возможное влияние немышечных клеток на электрофизиологию сердца и механочувствительность не должны игнорироваться. Например, множество недавних экспериментальных и клинических исследований связывают вызванные растяжением аритмии со степенью фиброза в сердечной ткани. Было высказано предположение, что это частично может быть вызвано эффектами растяжения, передаваемого через немышечные клетки. Следовательно, для всестороннего понимания механоэлектрической обратной связи в сердце полезно обсуждать эффекты растяжения на различных клеточных популяциях сердца, включая фибробласты.

Величина потенциала покоя фибробластов сердца лягушки и крысы лежит в диапазоне от –5 до –70 мВ. Характер распределения клеток в группы по величине потенциала покоя показал, что наиболее часто встречаются клетки с потенциалом покоя в пределах –10...–15 мВ ((–22 ± 2) мВ) для крысы и –20...–25 мВ (–31 ± 3) мВ) для лягушки. Среднее значение величины потенциала покоя фибробластов предсердия человека равно (–16 ± 2) мВ. Низкая величина мембранного потенциала характерна для фибробластов. Так, мембранный потенциал изолированных мышиных фибробластов различных линий в культуре ткани лежит в диапазоне от –13 до –17 мВ; от –15 до –40 мВ; от –20 до –25 мВ; от –10 до –20 мВ.

Величина входного сопротивления (R_{in}) фибробластов в сердце лягушки достигала 1 ГОм ((1,1 ± 0,1) ГОм), а у крысы была несколько меньше — от 0,5 до 1 ГОм ((510 ± 10) МОм). Величина R_{in} фибробластов предсердия человека гораздо больше и достига-

ет (4,4±0,1) ГОм. Более точное измерение, по мнению авторов, было затруднительно, так как работы выполнялись на ткани, а не на изолированных клетках. Эти значения близки к данным, представленным в работах других авторов. Так, R_{in} мембран изолированных мышиных фибробластов линии 3Т3 в культуре ткани равно 1 ГОм и выше. Высокая величина R_{in} мембран у клеток этой линии в культуре ткани была зарегистрирована и другими авторами. Для изолированных фибробластов L-линии в культуре ткани R_{in} мембран также было более 1 ГОм. Еще более высокое R_{in} фибробластов, величина которого лежала в пределах 25 ГОм, было обнаружено в культуре ферментативно выделенных фибробластов сердец новорожденных крыс.

Показано, что в ритме спонтанных сокращений ткани сердца лягушки и крысы у фибробластов регистрируются осцилляции мембранного потенциала, которые были названы mechanically induced potentials (MIP). Форма MIP, представленная на рис. 11.68, принципиально отличается от формы потенциалов действия кле-

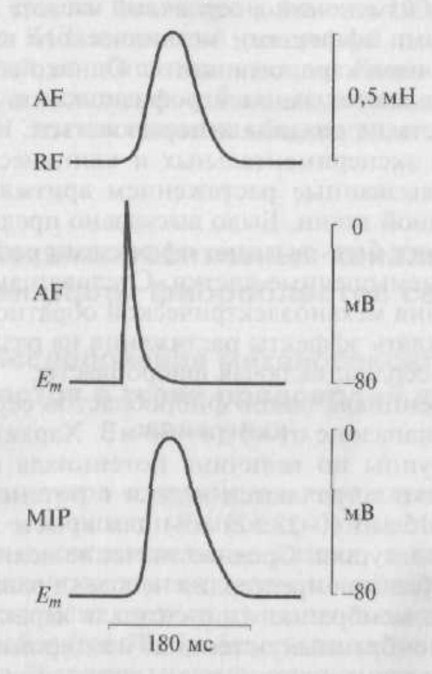


Рис. 11.68. Синхронная регистрация механограммы (верхняя кривая), потенциалов действия кардиомиоцита (средняя кривая) и механоиндуцированных потенциалов фибробласта (нижняя кривая) в правом предсердии крысы:

AF — active force; RF — resting force; AP — потенциал действия кардиомиоцита; MIP — механоиндуцированный потенциал фибробласта; E_m — величина мембранного потенциала

ток сердца. Амплитуда зарегистрированных MIP была либо соизмерима с величиной мембранного потенциала, либо значительно меньше его.

На рис. 11.68 показаны синхронно зарегистрированные механограмма сокращений препарата правого предсердия крысы (верхняя кривая), потенциал действия кардиомиоцита (средняя кривая) и MIP фибробласта (нижняя кривая). Два последних биопотенциала зарегистрированы при помощи пары микроэлектродов, находящихся на расстоянии друг от друга не более 50 мкм. Потенциал действия кардиомиоцита имеет нормальный овершут и типичную амплитуду. Полученный от немышечной клетки синоатриального узла MIP, отличается от биоэлектрической активности нормальных миокардиальных клеток. У этого потенциала нет овершута и он начинается позднее с задержкой, определяемой видом животного. Длительность этого потенциала соответствует длительности механограммы препарата предсердия. Однако если фаза сокращения препарата и фаза нарастания MIP относительно синхронны, то в фазу расслабления препарата падение MIP может быть короче или длиннее ее.

Mechanically induced potental фибробласта возникает с задержкой относительно потенциала действия кардиомиоцита, расположенного не далее чем 50 мкм (рис. 11.69). Величина этой задержки для сердца лягушки составляла 80—100 мс (рис. 11.69, *а*), а для сердца крысы — 10 мс (рис. 11.69, *б*). Обнаружено, что фибробласты сердца являются электроневозбудимыми клетками. Отсутствие влияния потенциалуправляемых каналов на механизм генерации MIP у исследуемых клеток подтверждают отсутствие овершута у

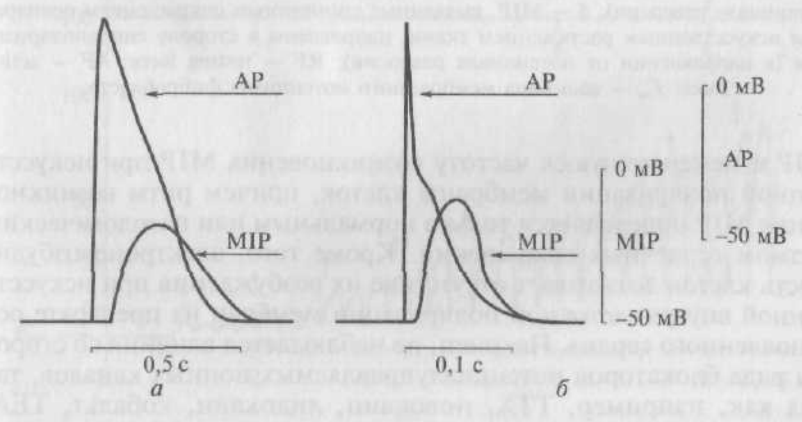


Рис. 11.69. Синхронная регистрация потенциала действия кардиомиоцита (AP) и механоиндуцированного потенциала фибробласта (MIP) в предсердии:

а — лягушки; *б* — крысы

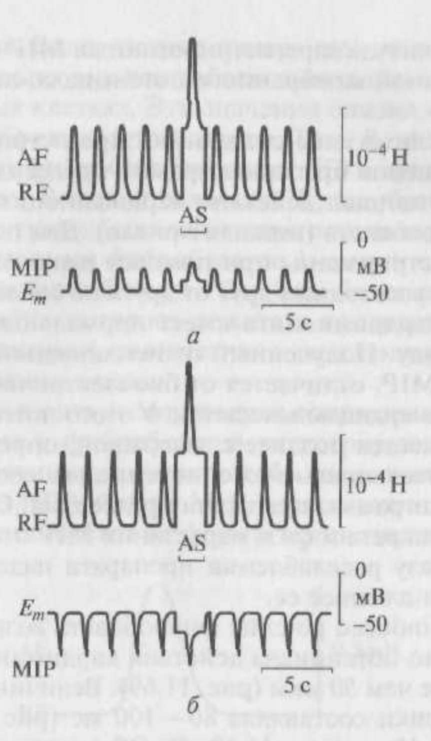


Рис. 11.70. Синхронная регистрация механограммы предсердия (верхняя кривая) и механоиндуцированных потенциалов фибробластов (нижняя кривая):

а — MIP, вызванные спонтанным сокращением препарата и искусственным растяжением ткани (AS), направлены в сторону деполяризации (в направлении к потенциалу реверсии); *б* — MIP, вызванные спонтанным сокращением препарата и искусственным растяжением ткани, направлены в сторону гиперполяризации (в направлении от потенциала реверсии); RF — resting force; AF — active force; E_m — величина мембранного потенциала фибробласта

MIP и неменяющуюся частоту возникновения MIP при искусственной поляризации мембраны клеток, причем ритм возникновения MIP определяется только нормальным или патологическим ритмом сердечных сокращений. Кроме того, электроневозбудимость клеток доказывает отсутствие их возбуждения при искусственной внутриклеточной поляризации мембран на препарате остановленного сердца. Наконец, не наблюдается влияния со стороны ряда блокаторов потенциалуправляемых ионных каналов, таких как, например, TTX, новокаин, лидокаин, кобальт, TEA. Данные об электроневозбудимости фибробластов были получены и другими авторами.

Было обнаружено, что MIP может быть направлен как в сторону деполяризации (рис. 11.70, *а*), так и в сторону гиперполяри-

зации (рис. 11.70, *б*). Вне зависимости от исходного направления MIP поляризация мембраны может вызывать противоположные реакции исследуемых клеток.

Если исходно MIP направлен в позитивную сторону, то искусственная гиперполяризация мембраны (рис. 11.71, *а*) приводит к увеличению амплитуды MIP — тем большему, чем на бо́льшую величину смещался потенциал. В этом случае MIP направлен в сторону потенциала реверсии, величина которого составляет порядка –7 мВ. Искусственная деполяризация мембраны (рис. 11.71, *б*) приводит к уменьшению амплитуды MIP — тем большему, чем бо́льшая поляризация имела место вплоть до полного прекращения возникновения MIP при достижении потенциала реверсии. При дальнейшем увеличении сдвига мембранного потенциала MIP вновь появлялись, но уже обратного знака, причем их амплитуда была тем больше, чем бо́льшая величина сдвига мембранного потенциала имела место, а направление пика также было в сторону потенциала реверсии.

Согласно предположению разных авторов исследуемые клетки имеют на мембране МСК, а MIP представляют собой аналог пи-

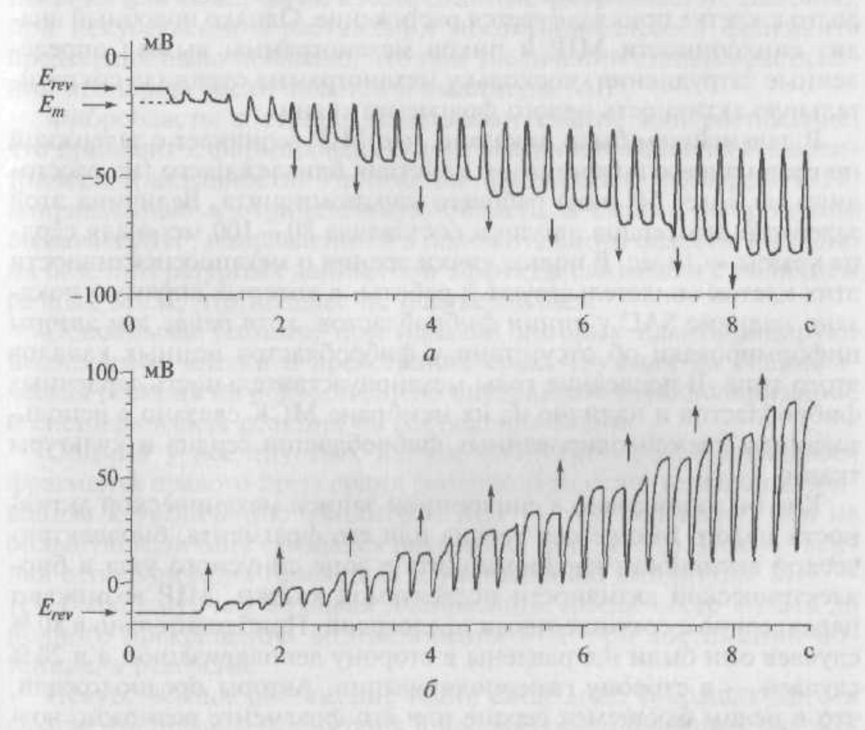


Рис. 11.71. Влияние на мембрану фибробласта сердца:

а — искусственной внутриклеточной деполяризации; *б* — гиперполяризации; E_m — величина мембранного потенциала фибробласта; E_{rev} — потенциал реверсии

ковых осцилляций потенциала покоя фибробластов, обсуждаемых в литературе.

Наличие на мембране исследуемых клеток МСК подтверждается данными об относительной синхронности MIP и механограммы. Кроме того, наблюдается корреляция между временем фазы нарастания и падения MIP и временем фазы сокращения и расслабления миокарда. Эксперименты, связанные с изменением температуры или добавлением фармакологических препаратов, свидетельствуют, что реакция клеток иная по сравнению с известными электровозбудимыми клетками сердца, и коррелирует с изменением сократительной активности сердца при аналогичных воздействиях. Наконец, наиболее показательными являются эксперименты с применением дозированного искусственного растяжения миокарда, которое вызывает появление MIP. Эти эксперименты показали, что длительность MIP определяется длительностью искусственного растяжения ткани. Отсутствие адаптации фибробластов к растяжению вызывало критическую дискуссию до тех пор, пока не было показано, что МСК не подвержены адаптации. Они находятся в состоянии активации столь долго, сколь долго к клетке прикладывается растяжение. Однако подобный анализ синхронности MIP и пиков механограммы вызвал определенные затруднения, поскольку механограмма отражала сократительную активность целого фрагмента ткани.

В дальнейшем было показано, что MIP возникает с задержкой по сравнению с потенциалом действия близлежащего (на расстоянии не более 50 мкм) рабочего кардиомиоцита. Величина этой задержки для сердца лягушки составляла 80—100 мс, а для сердца крысы — 10 мс. В пользу точки зрения о механосенситивности этих клеток свидетельствуют и работы, в которых впрямую показано наличие SAC у линии фибробластов, хотя ранее эти авторы информировали об отсутствии у фибробластов ионных каналов этого типа. В последние годы механочувствительность сердечных фибробластов и наличие на их мембране МСК связано с использованием свежеизолированных фибробластов сердца и культуры ткани.

Как было показано в синхронной записи механической активности целого бьющегося сердца или его фрагмента, биоэлектрической активности кардиомиоцита в зоне синусного узла и биоэлектрической активности исследуемой клетки, MIP возникают параллельно с сокращениями предсердий. Приблизительно в 80 % случаев они были направлены в сторону деполяризации, а в 20 % случаев — в сторону гиперполяризации. Авторы предположили, что в целом бьющемся сердце или его фрагменте возможно возникновение растяжения и сжатия фибробластов и, следовательно, развитие двухкомпонентной реакции. В подавляющем большинстве случаев сокращение (сжатие) ткани предсердий приво-

дит к сжатию изучаемых клеток, и это вызывает MIP, направленные в сторону деполяризации. Однако сокращение ткани предсердий может приводить и к растяжению части исследуемых клеток. В этих случаях MIP направлены в сторону гиперполяризации.

Дальнейшие эксперименты подтверждают это предположение. При искусственном растяжении, прикладываемом в промежутках между спонтанными MIP, было показано, что если эти MIP направлены в сторону деполяризации и, следовательно, клетка при сокращениях предсердия испытывает сжатие, то искусственное растяжение предсердия приводит в большинстве случаев к растяжению данной клетки и вызывает MIP, направленные в сторону гиперполяризации, а в части случаев приводит к ее сжатию и вызывает MIP, направленные в сторону деполяризации. Если спонтанные MIP направлены в сторону гиперполяризации и, следовательно, клетка при сокращениях предсердия испытывает растяжение, то наблюдается аналогичное влияние растяжения ткани. Эти исследования были полностью подтверждены с использованием метода patch-clamp в конфигурации whole-cell на фоне растяжения или компрессии изолированных фибробластов. Наконец, при искусственном растяжении несокращающегося фрагмента предсердия было показано, что при увеличении степени растяжения препарата увеличивается и амплитуда MIP.

Фибробласты в сердце испытывают сжатие или растяжение, что приводит к формированию двух различных типов их биоэлектрической активности. Растяжение фибробласта вызывает MIP, направленный в отрицательную область, а сжатие фибробласта вызывает MIP, направленный в положительную область. Исходно на базе литературных данных эти эффекты связывали с наличием разных МСК, что позднее не подтвердилось.

Основными тестами, при помощи которых идентифицируют исследуемые клетки в предсердиях крыс, служили их специфическая реакция на искусственную внутриклеточную поляризацию и специфическая реакция на растяжение ткани.

Обычно у исследуемых клеток спонтанно сокращающегося фрагмента правого предсердия гиперполяризация мембраны приводила к увеличению амплитуды MIP — тем большему, чем на бóльшую величину смещался потенциал (рис. 11.72). Искусственная деполяризация приводила к уменьшению амплитуды MIP — тем большему, чем бóльшая поляризация имела место вплоть до полного прекращения возникновения MIP при достижении потенциала реверсии.

Искусственное растяжение ткани спонтанно сокращающегося фрагмента правого предсердия в подавляющем большинстве экспериментов приводило к вероятному растяжению клетки и к гиперполяризации мембраны фибробласта и соответственно к увеличению амплитуды MIP — тем большему, чем бóльшую величи-

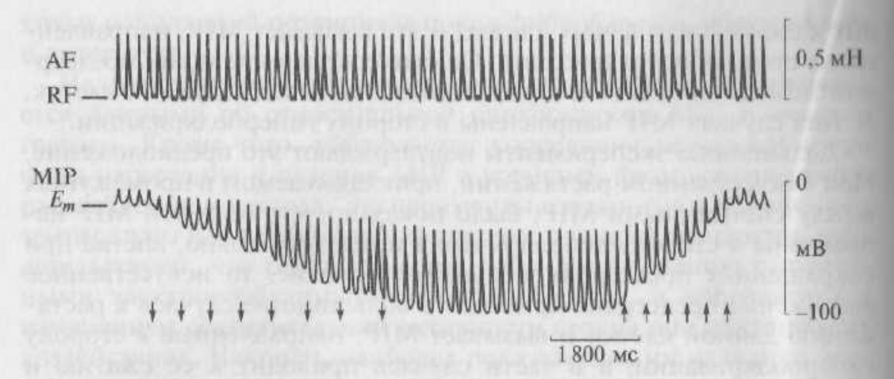


Рис. 11.72. Влияние искусственной внутриклеточной поляризации мембраны фибробласта предсердия крысы на биоэлектрическую активность. Синхронная регистрация механограммы (верхняя кривая) и механоиндуцированных потенциалов фибробласта (нижняя кривая):

символ (↓) — моменты гиперполяризации, символ (↑) — моменты деполяризации мембраны; AF — active force; RF — resting force; MIP — механоиндуцированный потенциал фибробласта; E_m — величина мембранного потенциала

ну имела механосенситивная гиперполяризация ткани (рис. 11.73), хотя в ряде случаев при растяжении ткани регистрировали и деполяризацию мембраны, вероятно, связанную со сжатием данной исследуемой клетки.

У лягушки исследуемые клетки достаточно часто выявляли в венозном синусе, а у крысы — в обоих предсердиях, но наиболь-

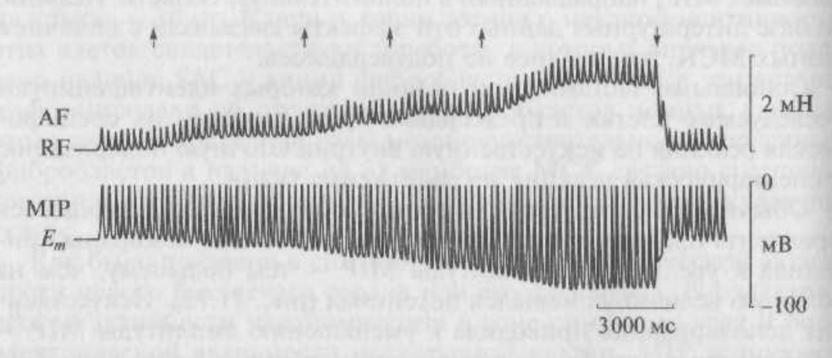


Рис. 11.73. Специфическая реакция фибробласта предсердия крысы на растяжение ткани при постоянной величине мембранного потенциала. Синхронная регистрация механограммы (верхняя кривая) и механоиндуцированных потенциалов фибробласта (нижняя кривая):

символ (↑) — моменты растяжения препарата, символ (↓) — момент возвращения величины растяжения препарата к исходному уровню; AF — active force; RF — resting force; MIP — механоиндуцированный потенциал фибробласта; E_m — величина мембранного потенциала

шее количество клеток, генерирующих MIP, у крысы регистрировали в синоатриальном узле. В желудочках лягушки и крысы фибробласты выявляли достаточно редко.

Для гистологической идентификации сердечных фибробластов в качестве теста использовали введение флюоресцентного красителя *Lucifer Yellow* или коллоидного золота. Структура кардиомиоцитов и фибробластов в предсердиях соответствовала литературным данным. Эти клетки связаны друг с другом.

11.3.2. Исследования механосенситивности изолированных фибробластов предсердий здоровых животных

Было высказано предположение, что MIP связан с работой МСК и Ca^{2+}-активируемых K^+-каналов. Обсуждался вопрос о том, что деполяризация клетки (фаза нарастания MIP) возникает в результате работы МСК, а гиперполяризация (фаза падения MIP) является следствием K^+-проводимости, которая активируется за счет увеличения концентрации цитозольного Ca^{2+}. Это увеличение концентрации Ca^{2+} может быть связано с двумя причинами — входом Ca^{2+} через МСК и выходом Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума на фоне механической деформации клетки. Однако А. Камкин и И. Киселева вместе с известным немецким ученым профессором Г. Изенбергом зарегистрировали ионные токи у свежеизолированных сердечных фибробластов в контроле и в условиях прямой механической деформации клетки (ее сдавливания или растяжения).

Свежеизолированные фибробласты перфузировали PSS* с добавлением 1,8 мкмоль/л $CaCl_2$ при температуре 37 °С. В качестве блокатора МСК использовали 8 мкмоль/л Gd^{3+}. При этой концентрации требовалось 5 мин для устойчивого блокирования МСК. Patch-пипетки были заполнены растворами с разным pCa. Раствор patch-пипетки с pCa 7 состоял, ммоль/л: из 140 KCl, 10 NaCl, 1 $MgCl_2$ и 5 мкмоль/л EGTA для уменьшения эффектов загрязнения Ca^{2+}. При этом подразумевается, что эффекты экзогенного Ca^{2+} будут минимальны. Раствор patch-пипеток с pCa 6 состоял, ммоль/л: из 140 KCl, 10 NaCl, 1 $MgCl_2$, 4,5 $CaCl_2$, 5 EGTA, доведенного HEPES/KOH до pH 7,4. Patch-пипетки с pCa 8 содержали 5 ммоль/л BAPTA вместо смеси Ca/EGTA. Для добавления АТФ 10 ммоль/л NaCl заменяли на 4 ммоль/л Na_2-АТФ и концентрацию $MgCl_2$ увеличивали до 5 ммоль/л. В других сериях 140 ммоль/л NaCl был заменен на 140 ммоль/л CsCl в обоих растворах: PSS и растворе patch-пипеток.

---

* Поли(3,4-этилендиокситиофен)поли(стиренсульфонат).

Вольт-амперные кривые были получены по результатам обработки серий из 20 импульсов длительностью 140 мс. Импульсы начинались от поддерживаемого потенциала –45 мВ и запускались с частотой 1 Гц. Измененные мембранные токи на уровне 130–140 мс после начала импульса (I_L) откладывались по отношению к потенциалу соответствующих шагов смещения. Пересечение результирующей *I—V*-кривой с осью потенциала означает потенциал нулевого тока (E_0), который соответствует потенциалу покоя некламппрованной клетки. Из *I—V*-кривых I_L до и после механической деформации фибробласта на уровне –45 и –90 мВ рассчитывали дифференциальный ток при сжатии клетки (compression induced difference current — I_{ci}) и дифференциальный ток при растяжении клетки (stretch-induced difference current — I_{sir}). Кроме того, из *I—V*-кривых определяли наклон проводимости при отрицательных потенциалах до E_0 (^-G) и между 0 и +50 мВ (^+G).

Механическая деформация сердечных фибробластов. Использовали метод прямой механической деформации клеток при помощи двух patch-пипеток. На рис. 11.74 показана механическая деформация изолированного фибробласта сердца. При помощи patch-пипетки (PP) получали конфигурацию whole-cell, после чего эту patch-пипетку фиксировали в постоянной позиции. При помощи второй patch-пипетки (SP) получали конфигурацию cell-attached, а для получения сжатия или растяжения клетки SP перемещали при помощи цифрового программируемого микроманипулятора относительно PP, которая служила началом отсчета. Обе пипетки устанавливали в отличие от экспериментов на культуре в края изолированного фибробласта (рис. 11.74, *а*). Аксиальная механическая деформация изолированной клетки воспроизводилась на линии SP—PP, но в данном случае по существу вся клетка подвергалась механической деформации. Растяжение клетки или ее сжатие вели к совершенно различным электрофизиологическим реакциям.

На рис. 11.74, *б* показано растяжение клетки, т.е. увеличение зоны SP—PP от 18 до 23 мкм (на 5 мкм) или на 28 % по сравнению с исходным состоянием (см. рис. 11.74, *а*). После растяжения SP возвращалась в исходную позицию и расстояние SP—PP было равно 18 мкм. Далее посредством перемещения SP в направлении к PP осуществляли сжатие клетки. На рис. 11.74, *в* продемонстрировано сжатие клетки, т.е. уменьшение зоны SP—PP от 18 до 15 мкм (на 3 мкм) или на 16 %. На каждой клетке такую схему растяжения и последующего сжатия можно было выполнить минимум 3 раза. При этом во всех случаях растяжение и сжатие приводили к диаметрально противоположным электрофизиологическим реакциям, а возвращение к исходной длине устраняло эффекты механического стресса клетки. На рис. 11.75 представлены флюоресцентные микрофотографии этого же эксперимента. Разу-

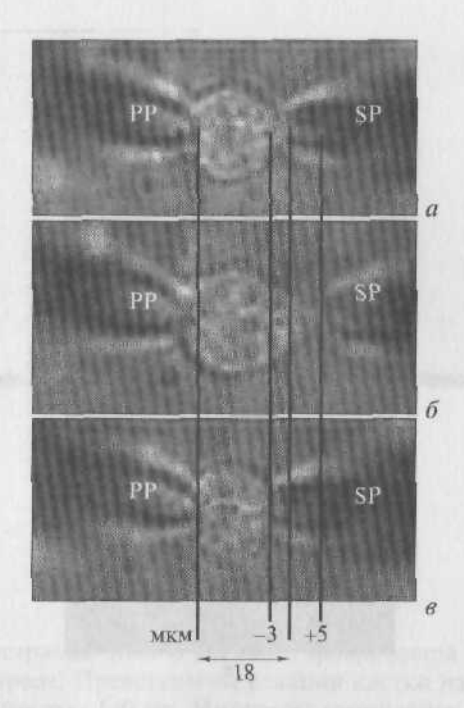


Рис. 11.74. Микрофотографии механической деформации изолированного сердечного фибробласта:

а — исходное (контрольное) состояние фибробласта; расстояние между patch-пипеткой, регистрирующей ионные токи в конфигурации whole-cell (PP), и patch-пипеткой, предназначенной для механической деформации клетки (SP), равно 18 мкм; *б* — растяжение фибробласта при помощи SP на 5 мкм относительно PP; дистанция SP—PP увеличивается на 28 %; *в* — сжатие фибробласта при помощи SP на 3 мкм относительно PP; дистанция SP—PP уменьшается на 16 %

меется, что в этом случае ни PP, ни SP не видно, а можно лишь указать зоны их расположения.

Электрофизиологическая идентификация сердечных фибробластов. Изолированные фибробласты выдерживали сильное растяжение (более 35 %) или выраженное сжатие (более 20 %), после чего giga seal обычно срывался. При исследовании клеток после получения конфигурации whole-cell потенциал фиксировали на уровне –45 мВ, т. е. на уровне величины, которая ближе к потенциалу мембраны при нулевом токе. Положительные ступеньки электрического тока вызывали выходящие токи, которые активировались приблизительно через 20 мс после пика выходящего тока и затем медленно инактивировались (рис. 11.76).

Исследуемые клетки действительно являются фибробластами, поскольку среди немышечных клеток сердца фибробластов более 90 %. Эти клетки не демонстрируют мембранных токов,

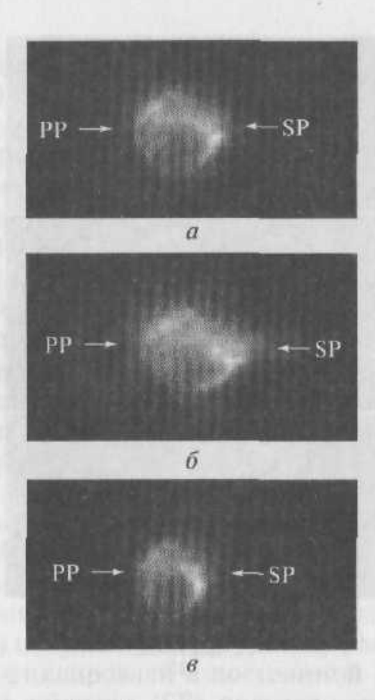


Рис. 11.75. Микрофотография флюоресценции изолированного сердечного фибробласта в контроле и при механической деформации:

а — исходное (контрольное) состояние фибробласта; расстояние между PP и SP равно 18 мкм; *б* — растяжение фибробласта при помощи SP на 5 мкм относительно PP; дистанция SP—PP увеличивается на 28 %; *в* — сжатие фибробласта при помощи SP на 3 мкм относительно PP; дистанция SP—PP уменьшается на 16 %

характерных для гладкой мышцы или эндотелиальных клеток. Кроме того, не было времязависимого входящего Ca^{2+}-тока в виде, типичном для миоцитов из коронарных артерий. После подачи положительных ступенек электрического тока регистрируемый ток падал с емкостным спайком до поддерживаемого тока приблизительно в 0 пА без появления входящего «хвостового» тока, типичного для активируемой деполяризацией Cl^--проводимости, характерной для эндотелиальных клеток. Когда клеточная поверхность повреждалась, клетка не сокращалась, как это типично для кардиомиоцитов. Указанные электрофизиологические свойства несовместимы с предположением, что анализируемые клетки были коронарными гладкомышечными или эндотелиальными. Вместе с отсутствием реакции меченых моноклональных антител к агонисту фактора фон Виллебранда было постулировано, что анализируемые клетки являются фибробластами.

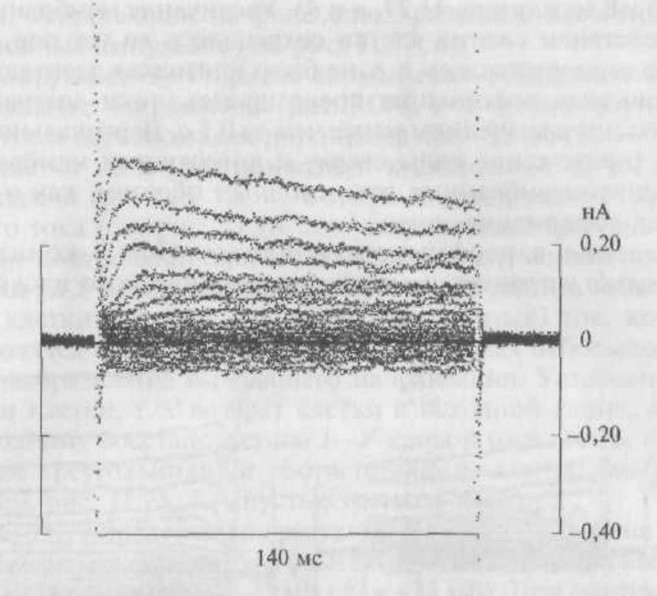


Рис. 11.76. Регистрация тока сердечного фибробласта в конфигурации whole-cell в контроле. Представлены реакции клетки на серию из 20 импульсов длительностью 140 мс. Импульсы начинались от поддерживаемого потенциала –45 мВ и запускались с частотой 1 Гц. Используемая patch-пипетка была заполнена электролитом на основе KCl с pCa 7

Недеформированные изолированные фибробласты имеют емкость мембраны, равную (18 ± 3) пФ. Как показано ранее фибробласты в сердечной ткани имеют значительные различия в величинах мембранного потенциала (от –70 до –10 мВ), что определяется их состоянием в ткани с позиций механической деформации. Однако изолированные клетки имеют сходное значение потенциала покоя. Показано, что I—V-кривые, отражающие I_L, пересекают ось потенциала при (–37 ± 3) мВ. Сопротивление мембраны равно (514 ± 11) МОм.

Увеличение проводимости мембраны фибробластов сжатием. Для сжатия изолированных фибробластов применяли аксиальное смещение SP относительно PP. При сжатии клетки поддерживаемый ток при –45 мВ становился отрицательным. На рис. 11.77, *б* показана реакция фибробласта на его сжатие на 2 мкм по сравнению с контрольной регистрацией, представленной на рис. 11.77, *а*.

Токи, индуцированные деполяризационными импульсами, на фоне сжатия клетки были похожи на токи в отсутствие механической деформации только в плане их развития во времени. Их амплитуды, однако, были значительно увеличены (сравните, например, наибольший ток в ответ на деполяризационный импульс

до +50 мВ между рис. 11.77, *а* и *б*). Увеличение мембранных токов под действием сжатия клетки сохранялось до тех пор, пока это сжатие поддерживалось, т.е. не было признаков адаптации. Когда механическая деформация прекращалась, токи возвращались к контрольным значениям менее чем за 0,5 с. Вертикальное сдавливание (приложение силы сверху к поверхности мембраны клетки) меняло мембранные токи сходным образом, как и горизонтальная деформация.

Введение в перфузионную камеру Gd^{3+} в концентрации 8 мкмоль/л устраняет смещение поддерживаемого тока и ингиби-

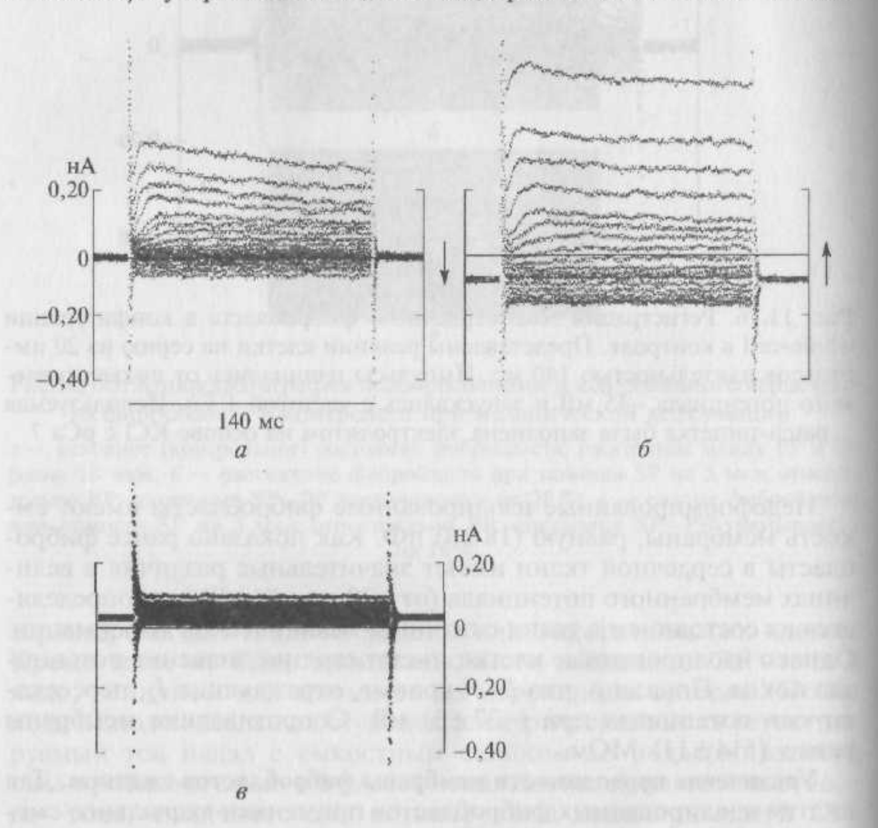


Рис. 11.77. Регистрация тока сердечного фибробласта в конфигурации whole-cell:

а — в контроле; *б* — на фоне сжатия на 2 мкм; *в* — на фоне продолжающегося сжатия в присутствии 8 мкмоль/л Gd^{3+}. Представлены серии из 20 импульсов длительностью 140 мс. Импульсы начинались от поддерживаемого потенциала –45 мВ и запускались с частотой 1 Гц. При сжатии нулевой ток при поддерживаемом потенциале смещается в негативную область (обозначено символом ↓) на 0,07 нА. В присутствии 8 мкмоль/л Gd^{3+} ток, возникающий при поддерживаемом потенциале, возвращается к исходному значению (обозначено символом ↑). Используемая patch-пипетка была заполнена электролитом на основе KCl с pCa 7

рует токи, возникающие на фоне деполяризационных и гиперполяризационных импульсов (см. рис. 11.77, *а*).

Результирующая *I—V*-кривая аномального выпрямления с током выходящего направления (рис. 11.78, *а* — пустые треугольники) в контроле пересекала ось потенциала при –20 мВ (E_0 = –20 мВ). Сжатие клетки на 2 мкм приводило к смещению E_0 в сторону деполяризации до –8 мВ (E_0 = –8 мВ) и индуцировало появление входящего тока (см. рис. 11.78, *а* — заполненные треугольники). Вычитание контрольной кривой из кривой, полученной при сжатии клетки на 2 мкм, давало возможность определить вызванный сжатием клетки дифференциальный (разностный) ток, который реверсировался при E_{rev} = 0 мВ и демонстрировал небольшое аномальное выпрямление выходящего направления. Устранение деформации клетки, т.е. возврат клетки к исходной длине, приводило к полному восстановлению *I—V*-кривой (рис. 11.78, *б* — заполненные треугольники) и соответствию ее контрольным значениям (см. рис. 11.78, *б* — пустые треугольники).

На рис. 11.79 представлена результирующая *I—V*-кривая для I_L до сжатия клетки (пустые треугольники). В контроле кривая пересекала ось потенциала при –25 мВ (E_0 = –25 мВ). При сжатии клетки на 3 мкм кривая для I_L (заполненные треугольники) пересекала ось потенциала при –5 мВ (E_0 = –5 мВ), при этом увеличивался входящий ток, а добавление в перфузионную камеру Gd^{3+} в кон-

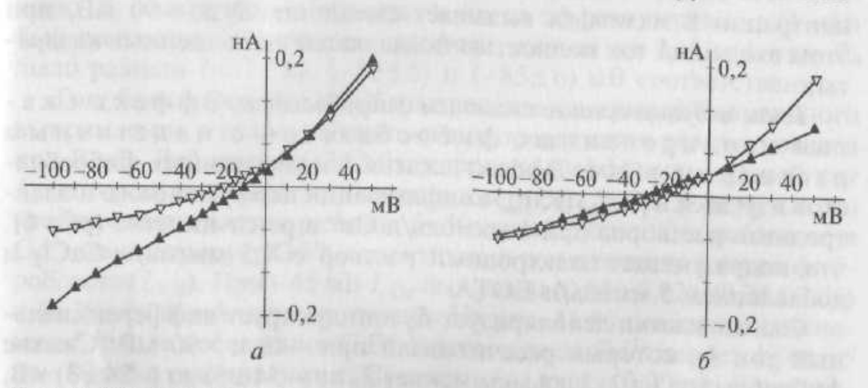


Рис. 11.78. Сдавливание клетки увеличивает базовую мембранную проводимость. Измерение мембранного тока проводилось в конце каждой из ступенек импульсов длительностью 140 мс и отложено по отношению к потенциалу каждой ступеньки. Точка пересечения *I—V*-кривой с осью потенциала является потенциалом (E_0) при токе, равном нулю:
а — контрольная кривая I_L (пустые треугольники, E_0 = –20 мВ), кривая I_L при сжатии клетки на 2 мкм (заполненные треугольники, E_0 = –10 мВ). Дифференциальный ток на фоне сжатия фибробласта определялся как I_L в контроле за вычетом I_L при сжатии клетки; *б* — контрольная кривая I_L (пустые треугольники; E_0 = –20 мВ), кривая I_L при устранении сжатия клетки (заполненные треугольники, E_0 = –22 мВ)

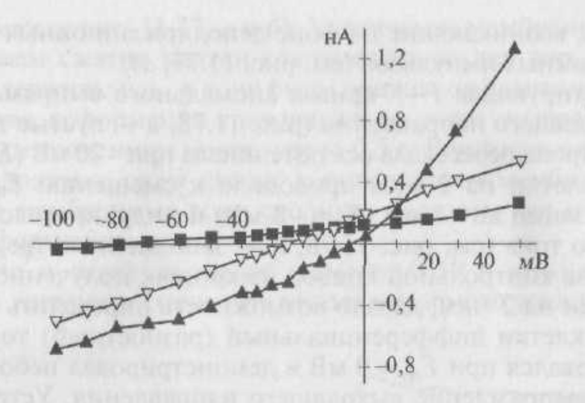


Рис. 11.79. Сжатие клетки увеличивает базовую мембранную проводимость. Измерение мембранного тока проведено в конце ступенек импульсов длительностью 140 мс по отношению к потенциалу каждой ступеньки. Точка пересечения *I—V*-кривой для I_L с осью потенциала является потенциалом (E_0) при токе, равном нулю. Контрольная кривая I_L (пустые треугольники, E_0 = –25 мВ), кривая I_L при сжатии клетки на 3 мкм (заполненные треугольники; E_0 = –5 мВ) и 5 мин после добавления 8 мкмоль/л Gd^{3+} на фоне продолжающегося сжатия фибробласта на 3 мкм (заполненные квадратики, E_0 = –90 мВ)

центрации 8 мкмоль/л вызывает смещение E_0 до –90 мВ, при этом входящий ток полностью подавляется (заполненные квадраты).

Токи, индуцированные сжатием фибробластов. Эффект сжатия изолированных фибробластов с пипеточным раствором pCa 6. Эффект сжатия изолированных фибробластов изучался в $[K^+]_{in}/[K^+]_{out}$-конфигурации перфузионного и электродного растворов при 1 мкмоль/л Ca^{2+} в patch-пипетке (pCa 6), что подразумевает электродный раствор с 4,5 ммоль/л $CaCl_2$ и добавлением 5 ммоль/л EGTA.

Сжатие клетки деполяризует E_0 и индуцирует дифференциальный ток I_{ci}, который рассчитывали при –45 и –90 мВ. Сжатие фибробластов на 2, 3 и 4 мкм меняет E_0 от (–34 ± 5) до (–24 ± 3) мВ, от (–35 ± 5) до (–10 ± 3) мВ и от (–33 ± 6) до (–5 ± 2) мВ соответственно. Вычитание тока I_L, зарегистрированного до сжатия клетки, из тока I_L, зарегистрированного при сжатии клетки на 2, 3 и 4 мкм на уровне –45 мВ, позволяет получить ток I_{ci} через МСК, индуцируемый компрессией и равный (–0,03 ± 0,01), (–0,18 ± 0,05) и (–0,34 ± 0,09) нА с E_{rev} (+5 ± 3), (+11 ± 2), (+16 ± 3) мВ соответственно.

На рис. 11.80 представлен типичный пример эффекта сжатия изолированного фибробласта. Сжатие клетки на 3 мкм деполяризует E_0 от –25 до –5 мВ и индуцирует дифференциальный ток I_{ci},

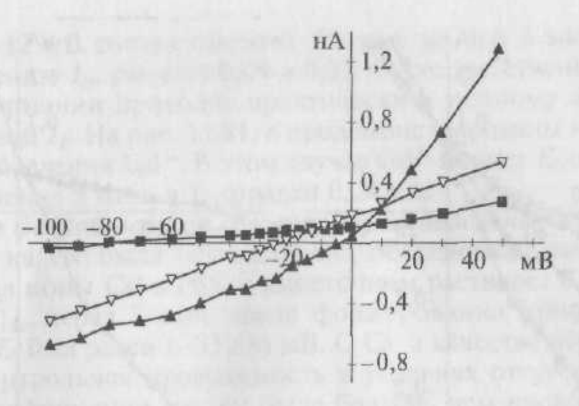


Рис. 11.80. Сжатие клетки увеличивает базовую мембранную проводимость. Точка пересечения *I—V*-кривой для I_L с осью потенциала является потенциалом (E_0) при токе, равном нулю. Контрольная кривая I_L (пустые треугольники, $E_0 = -25$ мВ), кривая I_L при сжатии клетки на 3 мкм (заполненные треугольники, $E_0 = -5$ мВ), кривая I_L через 5 мин после добавления 8 мкмоль/л Gd^{3+} на фоне продолжающегося сжатия фибробласта (заполненные квадратики, $E_0 = -90$ мВ)

равный –0,12 нА. Эксперимент заканчивался добавлением 8 мкмоль/л Gd^{3+} в перфузионный раствор. Добавление Gd^{3+} смещало E_0 в негативную область, и когда эффект через (5 ± 1) мин был полностью реализован, на фоне сжатия на 2, 3 и 4 мкм E_0 было равным (–87 ± 6), (–80 ± 5) и (–85 ± 6) мВ соответственно.

Ток, блокируемый Gd^{3+}, был представлен кривой аномального выпрямления с током выходящего направления и реверсировался при 0 мВ. Добавление Gd^{3+} блокировало дифференциальный ток I_{ci}, который возникал при сжатии клеток на 2, 3 и 4 мкм, т. е. на уровне сжатия клеток разница *I—V*-кривых до и после добавления Gd^{3+} демонстрирует Gd^{3+}-сенситивный ток в течение сжатия фибробласта (I_{ciGd}). При –45 мВ I_{ciGd} был равен (0,04 ± 0,02), (0,24 ± 0,05) и (0,38 ± 0,08) нА соответственно. На рис. 11.80 показаны изменения I_L после добавления Gd^{3+}. В этом случае Gd^{3+} меняет E_0 от –5 до –80 мВ в течение 6 мин. При этом I_{ciGd} равен 0,20 нА. В некоторых экспериментах после сжатия клетки и после наступления эффекта Gd^{3+} соединение отмывалось перфузией стандартным раствором Тироде. После 20 мин эффект Gd^{3+} был устранен и регистрировали реакцию на сжатие клетки, подобную той, которая была до введения Gd^{+3}. Эту реакцию можно было устранить, вернув деформированную клетку в исходное состояние. При исходном введении 8 мкмоль/л $GdCl_3$ сжатие клетки не модифицировало I_L.

Эффект сжатия изолированных фибробластов с пипеточным раствором pCa 7. Эффект сжатия изолиро-

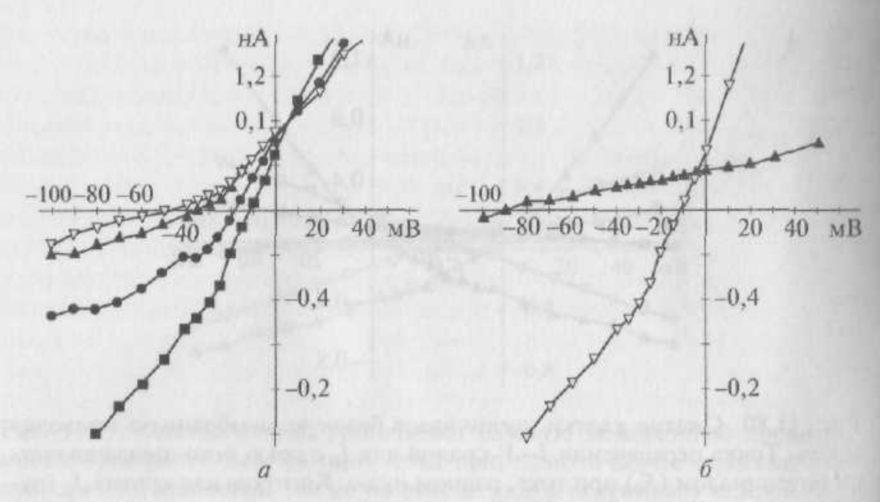


Рис. 11.81. Сжатие изолированного фибробласта увеличивает базовую мембранную проводимость:

а — контрольная кривая I_L (пустые треугольники, E_0 = –45 мВ), кривая I_L при сжатии клетки на 2 мкм (заполненные кружки, E_0 = –18 мВ), кривая I_L при сжатии клетки на 3 мкм (заполненные квадратики, E_0 = –12 мВ), кривая I_L при устранении сжатия клетки (заполненные треугольники, E_0 = –38 мВ). Достаточно редко удается получить кривую I_L, абсолютно точно повторяющую контрольную кривую. Это связано как с эластическими свойствами мембраны, так и с определенной погрешностью (не более 5 % у аппаратуры); *б* — кривая I_L при сжатии клетки на 3 мкм (пустые треугольники, E_0 = –12 мВ) и через 5 мин после добавления 8 мкмоль/л Gd^{3+} на фоне продолжающегося сжатия клетки (заполненные треугольники, E_0 = –90 мВ)

ванных фибробластов изучался в $[K^+]_{in}/[K^+]_{out}$-конфигурации перфузионного и электродного растворов при pCa 7 в последнем. Сжатие клетки деполяризует E_0, индуцирует дифференциальный ток I_{cl}, который рассчитывали при –45 и –90 мВ. Сжатие фибробластов на 2 и 3 мкм меняет E_0 от (–36 ± 7) до (–17 ± 3) мВ и от (–36 ± 8) до (–10 ± 2) мВ. При –45 мВ сжатие на 2 и 3 мкм индуцирует дифференциальный ток I_{cl}, равный (–0,06 ± 0,02) и (–0,20 ± 0,04) нА. Индуцированный компрессией дифференциальный ток I_{cl} имел потенциал реверсии (0 ± 2) и (5 ± 2) мВ соответственно. Раствор $GdCl_3$ в концентрации 8 мкмоль/л, добавленный в течение продолжающегося сжатия клетки на 2 и 3 мкм, смещает E_0 в первом случае до (–88 ± 6) мВ, а во втором — до (–90 ± 4) мВ в течение (5 ± 1) мин. При –45 мВ I_{clGd} был равен (–0,08 ± 0,02) и (–0,23 ± 0,07) нА для 2 и 3 мкм сжатия соответственно. При исходном введении 8 мкмоль/л $GdCl_3$ сжатие клетки не модифицировало I_L.

На рис. 11.81, *а* показан пример сжатия изолированного фибробласта на 2 и 3 мкм, в течение которого E_0 меняется от –45

до –18 и –12 мВ соответственно. Сжатие на 2 и 3 мкм ведет к возникновению I_{ci}, равного 0,09 и 0,22 нА соответственно. Устранение деформации приводит практически к полному восстановлению кривой I_L. На рис. 11.81, *б* продемонстрированы изменения I_L после добавления Gd^{3+}. В этом случае Gd^{3+} меняет E_0 от –12 до –90 мВ в течение 5 мин, а I_{ciGd} равен 0,24 нА.

Сжатие фибробластов в условиях измененного ионного состава. Замена K^+ на Cs^+ была осуществлена посредством замены всех ионов K^+ на ионы Cs^+ в PSS и пипеточном растворе. В растворах $[Cs^+]_{in}/[Cs^+]_{out}$ через 5 мин после формирования конфигурации whole-cell E_0 был равен (–33 ± 8) мВ. С Cs^+ в качестве переносчика зарядов контрольная проводимость в условиях отсутствия механической деформации клетки была больше, чем проводимость в растворах, содержащих K^+. В $[Cs^+]_{in}/[Cs^+]_{out}$-растворах сжатие клетки на 3 мкм деполяризует E_0 от (–33 ± 8) до (–8 ± 4) мВ. При –45 мВ сжатие на 3 мкм индуцирует дифференциальный ток I_{ci}, равный (–0,25 ± 0,08) нА. Дифференциальный ток, индуцированный сжатием клетки, был представлен кривой аномального выпрямления с током выходящего направления и реверсировался при (0 ± 3) мВ. Добавление 8 мкмоль/л $GdCl_3$ на фоне сжатия клетки гиперполяризует E_0 до (–85 ± 4) мВ и ингибирует I_{ci}. После (5 ± 1) мин I_{ciGd} был равен (0,27 ± 0,08) нА. Эти данные свидетельствуют о том, что ионы Cs^+ могут переносить ток через активируемые компрессией Gd^{3+}-сенситивные МСК. Кроме того, данные демонстрируют, что ионы Cs^+ переносят ток и проницаемость для Cs^+ лучше, чем для K^+.

Растяжение уменьшает проводимость мембраны фибробластов. Для осуществления растяжения клеток применяли аксиальное растяжение. На рис. 11.82 продемонстрированы токи, которые были зарегистрированы в контрольных экспериментах у недеформированной клетки (см. рис. 11.82, *а*), в экспериментах при растяжении клетки на 2 мкмоль/л (рис. 11.82, *б*), и в экспериментах с добавлением 8 мкмоль/л Gd^{3+} на фоне длящегося стабильного растяжения фибробласта или фрагмента его мембраны (рис. 11.82, *в*).

Во-первых, из рисунка следует, что растяжение клетки сдвигает ток, регистрируемый при поддерживаемом потенциале, в позитивное направление (начало у рис. 11.82, *б* по сравнению с началом у рис. 11.82, *а*).

Во-вторых, растяжение клетки уменьшает амплитуду токов по сравнению с контролем при применении как деполяризующих, так и гиперполяризующих смещений потенциала относительно поддерживаемого потенциала, хотя их временна́я зависимость остается той же.

Таким образом, растяжение клетки, по-видимому, приводит к уменьшению проводимости мембраны. Перфузия 8 мкмоль/л Gd^{3+} вызывает дальнейшее уменьшение токов через мембрану (см. рис.

11.82, *в*) и сдвигает ток, регистрируемый при поддерживаемом потенциале, в еще более позитивное направление (начало у рис. 11.82, *в* по сравнению с началом у рис. 11.82, *а* и *б*).

На рис. 11.83 показан основной эффект сжатия клетки, устранения этой деформации и последующего растяжения клетки, причем все данные зарегистрированы на одном изолированном фибробласте. Сжатие на 3 мкм смещает E_0 от –35 до –30 мВ (рис. 11.83, *а*) и ведет к увеличению I_L (I_{cl} = –0,12 нА). Устранение этой дефор-

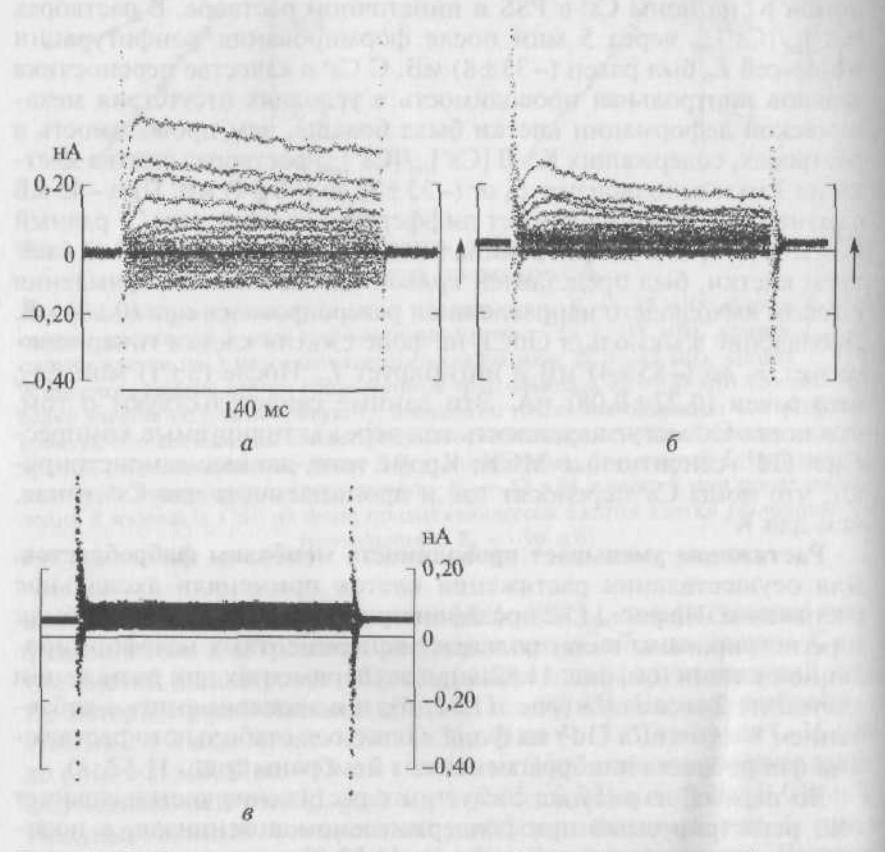


Рис. 11.82. Регистрация тока сердечного фибробласта в конфигурации whole-cell:

а — в контроле; *б* — на фоне растяжения клетки на 2 мкм; *в* — на фоне продолжающегося растяжения клетки в присутствии 8 мкмоль/л Gd^{3+}. Представлены серии из 20 импульсов длительностью 140 мс. Импульсы начинались от поддерживаемого потенциала –45 мВ и запускались с частотой 1 Гц. При растяжении нулевой ток при поддерживаемом потенциале смещается в позитивную область (обозначено символом ↑) на 0,05 нА. В присутствии 8 мкмоль/л Gd^{3+} ток, возникающий при поддерживаемом потенциале, еще в большей степени смещается в позитивную область (обозначено символом ↑). Используемая patch-пипетка была заполнена электролитом на основе KCl с pCa 7

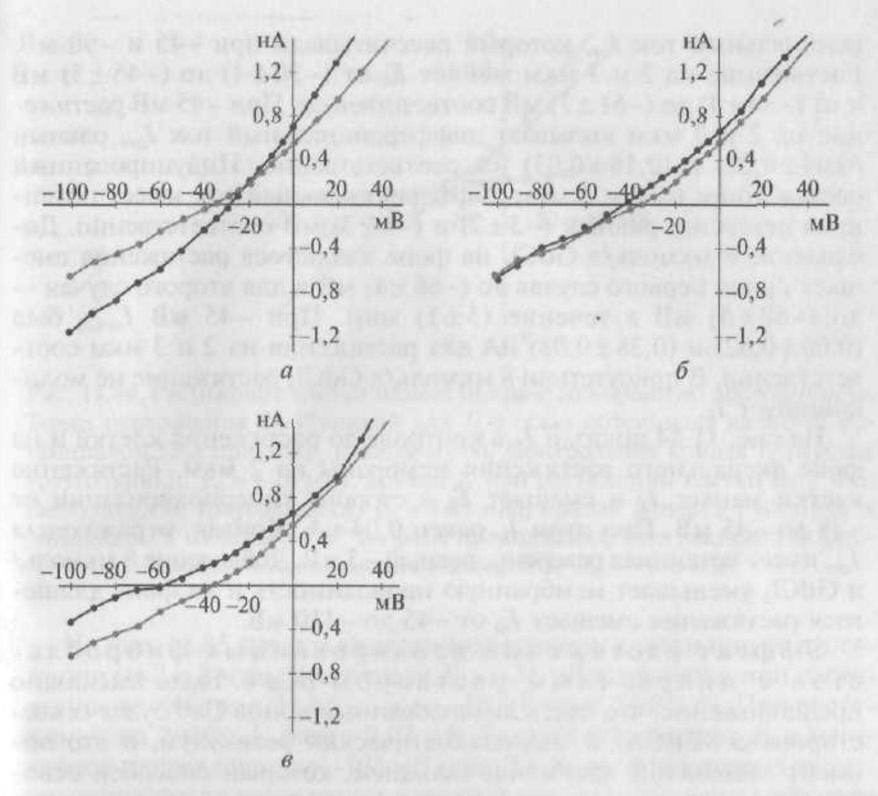


Рис. 11.83. Сжатие и растяжение клетки по-разному меняет базовую мембранную проводимость. Измерение мембранного тока проведено в конце ступенек импульсов длительностью 140 мс по отношению к потенциалу каждой ступеньки. Точка пересечения *I—V*-кривой с осью потенциала является потенциалом (E_0) при токе, равном нулю:

а — сжатие клетки. Контрольная кривая I_L (светлая кривая, $E_0 = -35$ мВ), кривая I_L при сжатии клетки на 3 мкм (темная кривая, $E_0 = -30$ мВ); *б* — устранение деформации клетки. Контрольная кривая I_L (светлая кривая, $E_0 = -35$ мВ), кривая I_L после устранения сжатия клетки (темная кривая, $E_0 = -37$ мВ); *в* — растяжение клетки. Контрольная кривая I_L (светлая кривая, $E_0 = -35$ мВ), кривая I_L при растяжении клетки на 3 мкм (темная кривая, $E_0 = -60$ мВ)

мации ведет к полному восстановлению I_L (рис. 11.83, *б*), а следующее за этим растяжение на 3 мкм ведет к сдвигу E_0 от −35 до −60 мВ. Растяжение меняет I_L ($I_{str} = 0{,}12$ нА). Этот эффект также реверсибелен.

Токи, индуцированные растяжением фибробластов. Эффект растяжения изолированных фибробластов с пипеточным раствором pCa 7. Был изучен эффект растяжения в $[K^+]_{in}/[K^+]_{out}$-конфигурации растворов с электродным раствором pCa 7. Растяжение гиперполяризует E_0, индуцирует диффе-

ренциальный ток I_{str}, который рассчитывали при –45 и –90 мВ. Растяжение на 2 и 3 мкм меняет E_0 от (–30±4) до (–45±5) мВ и от (–34±4) до (–61±7) мВ соответственно. При –45 мВ растяжение на 2 и 3 мкм вызывает дифференциальный ток I_{str}, равный (0,04±0,02) и (0,18±0,03) нА соответственно. Индуцированный растяжением на 2 и 3 мкм дифференциальный ток имеет потенциал реверсии, равный (–3±2) и (–8±3) мВ соответственно. Добавление 8 мкмоль/л $GdCl_3$ на фоне длящегося растяжения смещает E_0 для первого случая до (–86±4) мВ и для второго случая — до (–88±5) мВ в течение (5±1) мин. При –45 мВ I_{strGd} был (0,06±0,02) и (0,38±0,08) нА для растяжения на 2 и 3 мкм соответственно. В присутствии 8 мкмоль/л $GdCl_3$ растяжение не модифицирует I_L.

На рис. 11.84 показан I_L в контроле до растяжения клетки и на фоне аксиального растяжения мембраны на 2 мкм. Растяжение клетки меняет I_L и смещает E_0 в сторону гиперполяризации от –28 до –45 мВ. При этом I_{str} равен 0,04 нА. Кривая, отражающая I_{str}, имеет потенциал реверсии, равный –3 мВ. Добавление 8 мкмоль/л $GdCl_3$ уменьшает мембранную проводимость и на фоне длящегося растяжения смещает E_0 от –45 до –110 мВ.

Эффект растяжения изолированных фибробластов с пипеточным раствором pCa 6. Было высказано предположение, что часть диализованных ионов Ca^{2+} будет секвестрирована SERCA* в эндоплазматический ретикулум, и это повысит заполнение хранилищ кальцием, который способен освобождаться.

Смесь 4,5 мкмоль/л $CaCl_2$ с добавлением 5 ммоль/л EGTA, доводящая Ca^{2+} в patch-пипетке до pCa 6 (1 мкмоль/л Ca^{2+}), была диализирована в клетки для создания возможности увеличения предполагаемой Ca^{2+}-активации g_K посредством увеличения цитозольной целлюлярной концентрации Ca^{2+} и Ca^{2+}-чувствительности внутриклеточных хранилищ. При физиологическом градиенте K^+ ($[K^+]_{in}/[K^+]_{out}$-конфигурация перфузионного и электродного растворов) при 1 мкмоль/л Ca^{2+} в пипетке растяжение на 2, 3 и 4 мкм вызывало гиперполяризацию E_0 от (–35±6) до (–43±6) мВ, от (–35±5) до (–52±3) мВ и от (–33±3) до (–82±8) мВ соответственно. При –45 мВ растяжение на 2, 3 и 4 мкм индуцирует дифференциальный ток I_{str} (0,05±0,02), (0,12±0,04) и (0,37±0,03) нА с E_{rev} (0±1), (–6±1) и (–10±2) мВ соответственно. Дальнейшее введение 8 мкмоль/л Gd^{3+} смещало E_0 в негативное направление и для растяжения на 2, 3 и 4 мкм это было (–97±5), (–98±4) и (–95±4) мВ соответственно в течение (5±1) мин. При –45 мВ I_{strGd} был равен (0,07±0,02), (0,15±0,03) и (0,55±0,12) нА при растяжении клетки на 2, 3 и 4 мкм соответственно.

---

* Кальциевый насос эндоплазматического ретикулума.

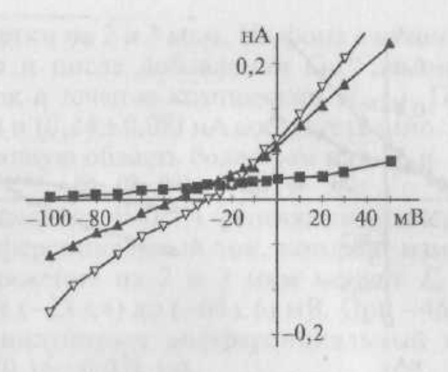


Рис. 11.84. Растяжение клетки меняет базовую мембранную проводимость. Точка пересечения *I*—*V*-кривой для I_L с осью потенциала является потенциалом (E_0) при токе, равном нулю. Контрольная кривая I_L (пустые треугольники, $E_0 = -28$ мВ), кривая I_L при растяжении клетки на 2 мкм (заполненные треугольники, $E_0 = -45$ мВ), кривая I_L через 5 мин после добавления 8 мкмоль/л Gd^{3+} на фоне продолжающегося растяжения фибробласта (заполненные квадраты, $E_0 = -110$ мВ)

На рис. 11.85 представлен пример реакции клетки при ее растяжении на 2 и 3 мкм. В контроле $E_0 = -33$ мВ и меняется при растяжении до −45 (рис. 11.85, *а*) и до −75 мВ (рис. 11.85, *б*). При растяжении на 2 мкм I_{str} равен 0,07 нА. Гадолиний смещает E_0 в негативное направление до −105 мВ (рис. 11.85, *в*). В некоторых экспериментах после растяжения клетки и после наступления эффекта Gd^{3+} соединение было отмыто перфузией стандартным раствором Тироде. После 20 мин эффект Gd^{3+} был устранен и регистрировали реакцию на растяжение, подобную той, которая была до введения Gd^{+3}. Эту реакцию можно было устранить, вернув растянутую клетку в исходное состояние. Исходно в присутствии 8 мкмоль/л $GdCl_3$ растяжение клетки не модифицирует поздние токи.

Действительно ли Ca^{2+} активирует K^+-проводимость $g_{K,Ca}$, содействуя механосенситивности? Результаты, полученные на фибробластах во фрагментах сердечной ткани с помощью микроэлектродных измерений позволили предположить, что растяжение и сдавление клетки модулируют мембранный потенциал сердечных фибробластов посредством активации МСК и через изменение в концентрации цитозольного внутриклеточного Ca^{2+}. Эта гипотеза была первично проверена и описана выше в опытах со смесью 4,5 ммоль/л $CaCl_2$ и добавлением 5 ммоль/л EGTA, доводящей Ca^{2+} в patch-пипетке до pCa 6 (1 мкмоль/л Ca^{2+}).

В этом подразделе описаны эксперименты, связанные с резким уменьшением концентрации Ca^{2+} посредством введения BAPTA в раствор patch-пипетки (pCa 8). Клеточный диализ начинался с момента прорыва клеточной мембраны, и первые измерения были

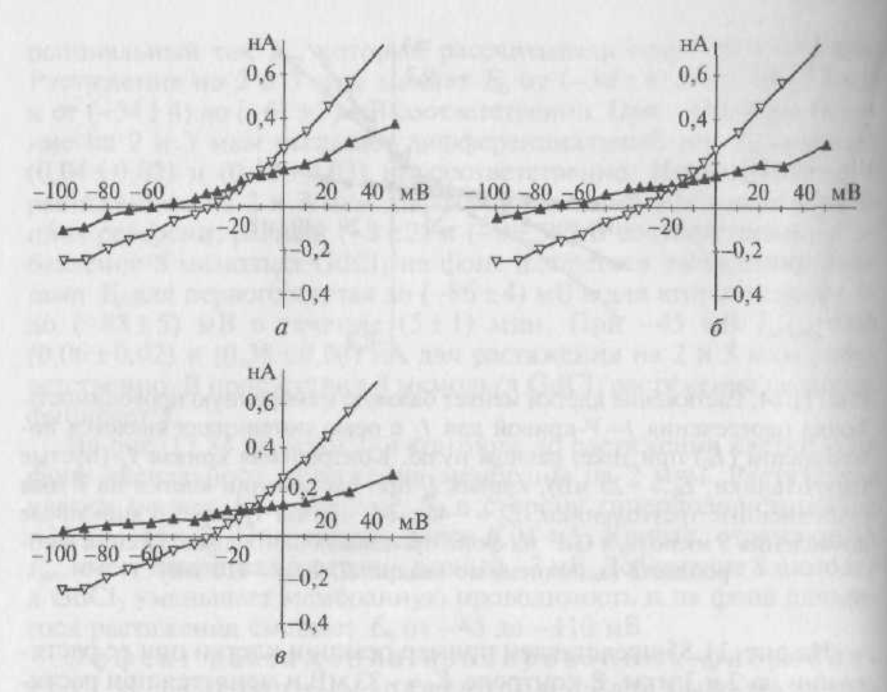


Рис. 11.85. Растяжение клетки меняет базовую мембранную проводимость. Точка пересечения I—V-кривой для I_L с осью потенциала является потенциалом (E_0) при токе, равном нулю:

а — растяжение клетки на 2 мкм. Контрольная кривая I_L (пустые треугольники, $E_0 = -33$ мВ), кривая I_L при растяжении клетки на 2 мкм (заполненные треугольники, $E_0 = -45$ мВ); *б* — последующее растяжение клетки до 3 мкм. Контрольная кривая I_L (пустые треугольники, $E_0 = -33$ мВ), кривая I_L при растяжении клетки до 3 мкм (заполненные треугольники, $E_0 = -75$ мВ); *в* — влияние 8 мкмоль/л Gd^{3+} на фоне продолжающегося растяжения фибробласта на 3 мкм. Контрольная кривая I_L (пустые треугольники, $E_0 = -33$ мВ), кривая I_L через 5 мин после добавления Gd^{3+} (заполненные треугольники, $E_0 = -105$ мВ)

выполнены через 5 мин после образования конфигурации whole-cell. В целом диализ BAPTA не устранял эффекты сжатия и растяжения клеток. Только у одной из девяти клеток BAPTA блокировал эффекты растяжения, хотя эффекты сжатия оставались без изменений.

В условиях диализа BAPTA сжатие клетки деполяризует E_0, индуцирует дифференциальный ток, который был рассчитан при −45 и −90 мВ. Сжатие на 2 и 3 мкм меняет E_0 от (−25 ± 4) до (−15 ± 3) мВ и от (−25 ± 3) до (−5 ± 3) мВ. При подобных величинах сжатия клетки индуцированный растяжением дифференциальный ток I_{cl} при −45 мВ был равен (0,04 ± 0,01) нА и (0,20 ± 0,09) нА с E_{rev} (0 ± 2) и (5 ± 3) мВ соответственно. Добавление 8 мкмоль/л Gd^{3+} блокирует дифференциальный ток I_{cl}, который возникает на

фоне сжатия клетки на 2 и 3 мкм. На фоне сжатия клетки разница I—V-кривых до и после добавления Gd^{3+} демонстрирует Gd^{3+}-сенситивный ток в течение компрессии (I_{ciGd}). При −45 мВ I_{ciGd} был (0,09 ± 0,02) и (0,24 ± 0,08) нА соответственно. Гадолиний смещает E_0 в негативную область более чем на −75 и −70 мВ соответственно.

В условиях диализа ВАРТА растяжение гиперполяризует E_0, индуцируя дифференциальный ток, который измерялся при −45 и −90 мВ. Растяжение на 2 и 3 мкм меняет E_0 от (−27 ± 3) до (−40 ± 5) мВ и от (−25 ± 4) до (−60 ± 6) мВ. При −45 мВ растяжение на 2 и 3 мкм индуцирует дифференциальный ток I_{str}, равный (0,05 ± 0,02) и (0,16 ± 0,03) нА.

Дифференциальный ток, индуцированный растяжением, имел потенциал реверсии, равный (5 ± 2) и (−5 ± 3) мВ соответственно. Добавленные в течение продолжающегося растяжения 8 мкмоль/л $GdCl_3$ смещают E_0 для первого случая до (−82 ± 3) мВ и для второго случая до (−98 ± 4) в течение (5 ± 1) мин. При −45 мВ I_{strGd} был равен (0,07 ± 0,02) и (0,20 ± 0,06) нА для 2 и 3 мкм растяжения клетки.

При исходном введении 8 мкмоль/л $GdCl_3$ растяжение не модифицировало мембранные токи.

На рис. 11.86 показан эффект сжатия в присутствии ВАРТА (рис. 11.86, *а*), релаксации (рис. 11.86, *б*) и реакции на растяжение (рис. 11.86, *в*). Сжатие на 2 мкм деполяризует E_0, от −20 до −10 мВ и индуцирует дифференциальный ток I_{ci}, равный 0,04 нА. Растяжение клетки на 2 мкм гиперполяризует E_0 от −20 до −50 мВ и индуцирует дифференциальный ток I_{ci} = −0,03 нА. Добавление 8 мкмоль/л $GdCl_3$, как и во всех случаях, гиперполяризовало клетку (рис. 11.86, *г*).

Таким образом, полученные данные не поддерживают ранее высказанную гипотезу о том, что гиперполяризация при растяжении обусловлена Ca^{2+}-активируемой K^+-проводимостью.

Растяжение фибробластов в условиях измененного ионного состава. Замена K^+ на Cs^+ была осуществлена посредством замены всех ионов K^+ на ионы Cs^+ в PSS и пипеточном растворе. Когда эксперименты выполняли в условиях замены ионов K^+ на ионы Cs^+, растяжение клетки на 2 мкм гиперполяризовало E_0 от (−35 ± 5) до (−45 ± 4) мВ, уменьшало ^-g от 2,6 до (2,1 ± 1,5) нСм и ^+g от 5,4 до (3,2 ± 2,0) нСм соответственно. С использованием растворов, в которых Cs^+ был основным катионом, добавление 8 мкмоль/л Gd^{3+} гиперполяризовало E_0 до (−88 ± 5) мВ. На фоне Gd^{3+} ни E_0, ни токи не менялись в условиях растяжения клетки или при ее реалаксации после растяжения.

Объяснение E_0. В простейших случаях g_{ns} работает параллельно с единичной K^+-проводимостью, которая обладает механической чувствительностью.

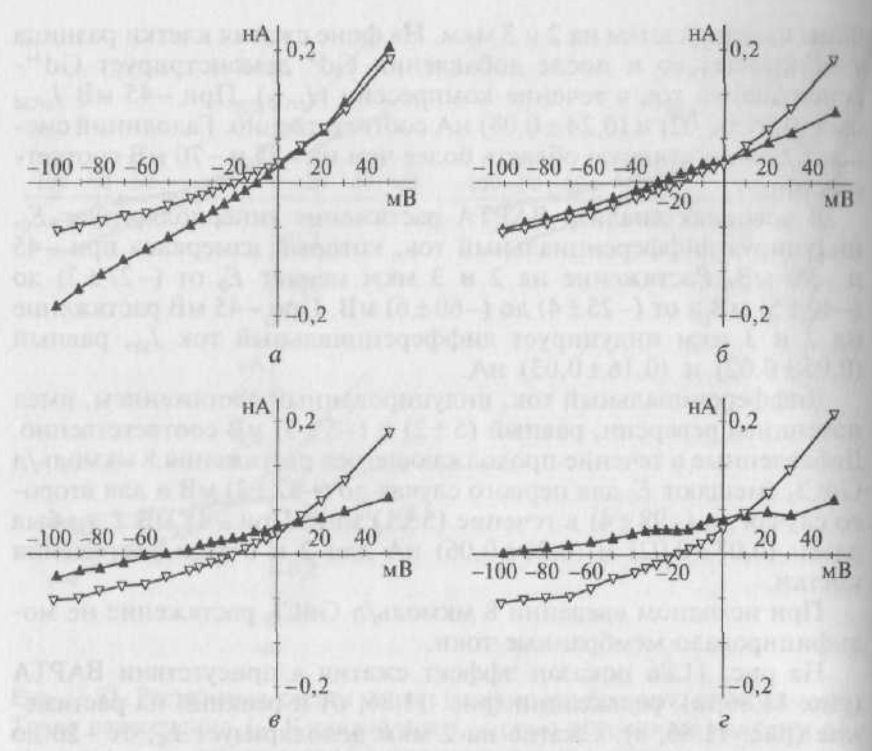


Рис. 11.86. Сжатие и растяжение клетки по-разному меняет базовую мембранную проводимость. В patch-пипетке находится BAPTA. Измерение мембранного тока проведено в конце ступенек импульсов длительностью 140 мс по отношению к потенциалу каждой ступеньки. Точка пересечения *I—V*-кривой с осью потенциала является потенциалом (E_0) при токе, равном нулю:

а — сжатие клетки. Контрольная кривая I_L (пустые треугольники, $E_0 = -20$ мВ), кривая I_L при сжатии клетки на 2 мкм (заполненные треугольники, $E_0 = -10$ мВ); *б* — устранение деформации клетки. Контрольная кривая I_L (пустые треугольники, $E_0 = -20$ мВ), кривая I_L после устранения сжатия клетки (заполненные треугольники, $E_0 = -25$ мВ); *в* — растяжение клетки. Контрольная кривая I_L (пустые треугольники, $E_0 = -20$ мВ), кривая I_L при растяжении клетки на 2 мкм (заполненные треугольники, $E_0 = -50$ мВ); *г* — влияние 8 мкмоль/л Gd^{3+} на фоне продолжающегося растяжения фибробласта на 2 мкм. Контрольная кривая I_L (пустые треугольники, $E_0 = -20$ мВ), кривая I_L через 5 мин после добавления Gd^{3+} (заполненные треугольники, $E_0 = -100$ мВ)

Тогда потенциал мембраны при нулевом токе можно представить как

$$R_m = 1/(\sum g_i) = 1/(g_K + g_{ns}),\ E_K = -90 \text{ мВ},\ E_{ns} = 0 \text{ мВ};$$

$$E_0 = R_m(g_{ns}E_{ns} + g_K E_K).$$

Вызванная растяжением инактивация g_{ns} сдвигает E_0 в более негативную область, т. е. вызывает гиперполяризацию мембраны в сторону E_K; наоборот, вызванная сдавливанием клетки активация g_{ns} деполяризует мембрану по направлению к E_{ns}. После блокирования g_{ns} с помощью Gd^{3+} мембранный потенциал вследствие гиперполяризации сдвигается в сторону E_K и становится не чувствительным к механической деформации. Таким образом, Gd^{3+}-нечувствительная проводимость есть механонечувствительная g_K, способная пропускать также ионы Cs^+.

Мнение о том, что проводимость g_{ns} является катионнеселективной, основывается на нескольких аргументах. Во-первых, потенциал реверсии был очень близок нулю, как и ожидалось для неселективного тока. Во-вторых, ток был не чувствителен к изменению градиента ионов Cl^-. В-третьих, эксперименты показали, что ток переносится немного лучше ионами Cs^+, чем K^+, и несколько хуже ионами Na^+. Коэффициент проницаемости $Cs^+ > K^+ > N^+$ атипичен для этого типа каналов. Как и ожидали для тока, текущего через неселективные каналы, ток блокировался Gd^{3+} в микромолярных концентрациях и ток, чувствительный к Gd^{3+}, имел реверсный потенциал 0 мВ. Однако известно, что Gd^{3+} блокирует также Ca^{2+}- и K^+-токи. Также и внеклеточные ионы Ca^{2+} могут взаимодействовать и блокировать канал с медленной частотой открытия, объясняя, таким образом, аномальное выпрямление с током выходящего направления, наблюдаемое в этом исследовании у тока, активируемого сжатием клетки.

Наблюдаемые различия в величине потенциала покоя недеформированных фибробластов были высокими (между –25 и –50 мВ). Еще больший разброс величин потенциала покоя был зарегистрирован и в работах, выполненных на фрагментах ткани и изолированных клетках. Это может быть вызвано различиями степени активации g_{ns} (так же как это возможно при индуцировании сдавливания при помощи имплантированных в клетки микроэлектродов или patch-пипетки, или in situ), и различиями в степени растяжения миокарда во время заполнения сердца кровью во время диастолы.

Независимо от того, находятся ли каналы в открытом или закрытом состоянии, конформация каналов будет определяться взаимодействием канального протеина с липидным бислоем. Согласно последней аллостерической модели ворот канала вызванная растяжением инактивация канала должна менять размеры белков механосенсора в липидном бислое. На основе приведенных экспериментальных данных можно представить, что g_{ns} будет небольшой и равной 0,5 нСм при растяжении клетки, значительной и равной 10 нС — при ее сдавливании. Если считать величину проводимости одного канала равной 20—30 пСм, можно предложить простую схему. На рис. 11.87 показано, что изолированные фиб-

Рис. 11.87. Модель, демонстрирующая, как сердечные фибробласты могут чувствовать прямую механическую деформацию

робласты могут содержать 500 неселективных МСК на клетку (10 000/20 с $P_0 = 1$) или 20 неселективных МСК на 1 мкм^2 мембраны клетки (1 пФ = 1 мкм^2). Когда экзогенная механическая энергия передается через цитоскелет к канальному белку, лежащему в липидном бислое, она может быть рассеяна. Как сообщалось, деполимеризация F-актина под действием цитохалазина D увеличивает эффективность сдавливания в индуцировании Gd^{3+}-чувствительного увеличения $[Ca^{2+}]_{in}$.

Настоящие результаты предполагают, что неселективные катионные каналы вносят существенный вклад как в проводимость мембраны, так и в потенциал покоя недеформированных сердечных фибробластов.

Приведенные эксперименты тестируют идею о том, что увеличение $[Ca^{2+}]_{in}$ контролировалось g_{ns}. Эта точка зрения поддерживается данными о входе Ca^{2+} через МСК у несердечных фибробластов, освобождением Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулюма у несердечных фибробластов и активацией Ca^{2+}-сенситивных K^+-каналов.

11.3.3. Исследования фибробластов в ткани предсердий с патологией

В предыдущем подразделе были показаны отличия электрофизиологических характеристик фибробластов предсердия человека в возрасте 65—78 лет от электрофизиологических характеристик фибробластов предсердия *животных*, *которые сводились* к увели-

чению мембранного потенциала и входного сопротивления клеток человека. Эти изменения определяются, по-видимому, не столько видовыми, сколько возрастными различиями. В связи с этой предпосылкой был выполнен ряд экспериментов.

Итак, важная проблема, вставшая при изучении сердечных фибробластов, — корреляция их параметров с возрастом животного. В этих экспериментах исследовали электрофизиологические особенности фибробластов правого предсердия молодых здоровых крыс (3 мес, 100 г) и старых здоровых крыс (15 мес, 400 г). В обеих группах животных на внешней и внутренней поверхностях в глубине ткани правого предсердия и непосредственно в зоне синусного узла идентифицировали фибробласты, величина мембранного потенциала которых варьировала в широком диапазоне от –5 до –70 мВ. Исследование величин мембранного потенциала у фибробластов сердца крыс массой 100 и 400 г выявило определенные различия в этих группах.

Распределение клеток в группы по величине мембранного потенциала у молодых крыс представлено на рис. 11.88, *а*, а для старых крыс — на рис. 11.88, *б*. Из них следует, что мембранный потенциал фибробластов предсердий молодых крыс был обычно в диапазоне от –10 до –15 мВ, а у старых крыс — от –20 до –25 мВ. Статистический анализ показал, что мембранный потенциал фибробластов молодых крыс равен (19,23 ± 1,02) мВ, а старых крыс — (29,41 ± 1,23) мВ. Сопротивление мембраны фибробластов предсердий молодых крыс было обычно в диапазоне от 0,4 до 0,6 ГОм, а у старых крыс от 0,7 до 0,9 ГОм.

Данные о величине мембранного потенциала и сопротивлении мембраны фибробластов выявляют определенную корреляцию этих

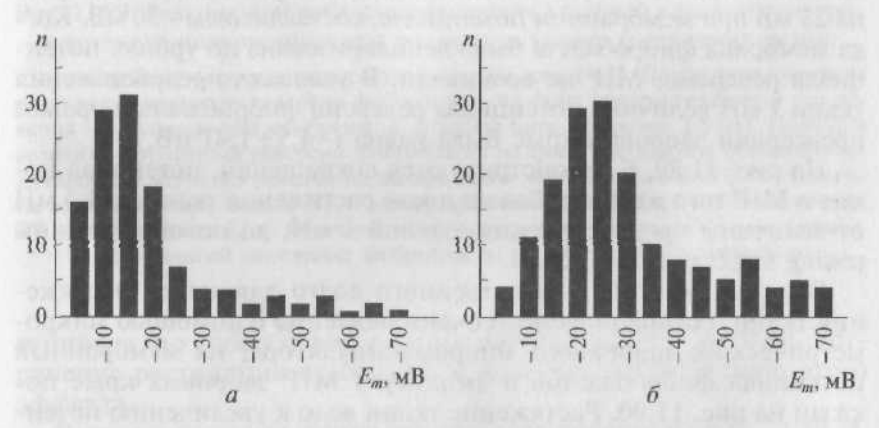


Рис. 11.88. Распределение исследуемых механосенситивных клеток в группы по величине мембранного потенциала в зоне синусного узла:

а — у молодых крыс массой 100 г; б — старых крыс массой 400 г

параметров. Ее существо сводится к тому, что чем больше сопротивление мембраны клетки, тем бо́льшая величина мембранного потенциала регистрируется.

В этих экспериментах инфаркт миокарда был вызван у крыс перевязыванием левой коронарной артерии, как это было описано ранее. Для экспериментов через 20 сут использовали крыс, имеющих мелкоочаговый инфаркт, идентифицируемый на ЭКГ, но неидентифицируемый визуально (0 %), очаговый инфаркт ((16,5 ± 0,6) %) и обширный инфаркт ((40 ± 1,3) %) левого желудочка. О развитии желудочковой гипертрофии и гипертрофии правого предсердия судили по увеличению массы этих камер по отношению к индексу массы тела. Вместе с тем у крыс с инфарктом (16,5 ± 0,6) % исследования проводили через 8, 20 и 30 сут. Были выявлены и другие гистологические проявления гипертрофии. Между фибробластами и кардиомиоцитами были найдены характерные контакты, которые образуются посредством тонких отростков фибробластов, прикрепляющих мембрану фибробластов к мембране кардимиоцитов.

Величина потенциала покоя фибробластов в контрольных экспериментах при стандартной низкой нагрузке 1 мН была в пределах от −70 до −5 мВ и в среднем составляла (−22 ± 1,9) мВ. Входное сопротивление этих клеток было (510 ± 10) МОм.

Потенциал покоя фибробласта, отмеченный на рис. 11.89, *а*, был равен приблизительно −29 мВ, а амплитуда MIP была около 15 мВ. В условиях фиксации тока потенциал покоя фибробласта (V_m) был смещен в более негативную область или в более позитивную область внутриклеточной подачей гиперполяризующего или деполяризующего тока соответственно (см. рис. 11.89, *а*). Амплитуда MIP возрастала с увеличением гиперполяризации и была равна 23 мВ при мембранном потенциале, составлявшем −50 мВ. Когда мембрана фибробласта была деполяризована до уровня потенциала реверсии, MIP не возникали. В условиях предрастяжения ткани 1 мН величина потенциала реверсии фибробласта в правом предсердии здоровых крыс была равна (−4,5 ± 1,4) мВ.

На рис. 11.89, *б* демонстрируются сокращения, потенциал покоя и MIP того же фибробласта после растяжения ткани на 1,5 мН от величины предрастяжения, равной 1 мН, до новой величины resting force, равной 2,5 мН.

Влияние эффекта искусственного долго длящегося растяжения ткани, осуществляемого очень медленно с помощью микрометрического цифрового микроманипулятора, на мембранный потенциал фибробластов и амплитуду MIP здоровых крыс показан на рис. 11.90. Растяжение ткани вело к увеличению потенциала покоя и соответственно увеличивало амплитуду MIP. При достижении величины от 1,8 до 2,0 мН (плюс 1 мН как предрастяжение) растяжение не вело к увеличению мембранного по-

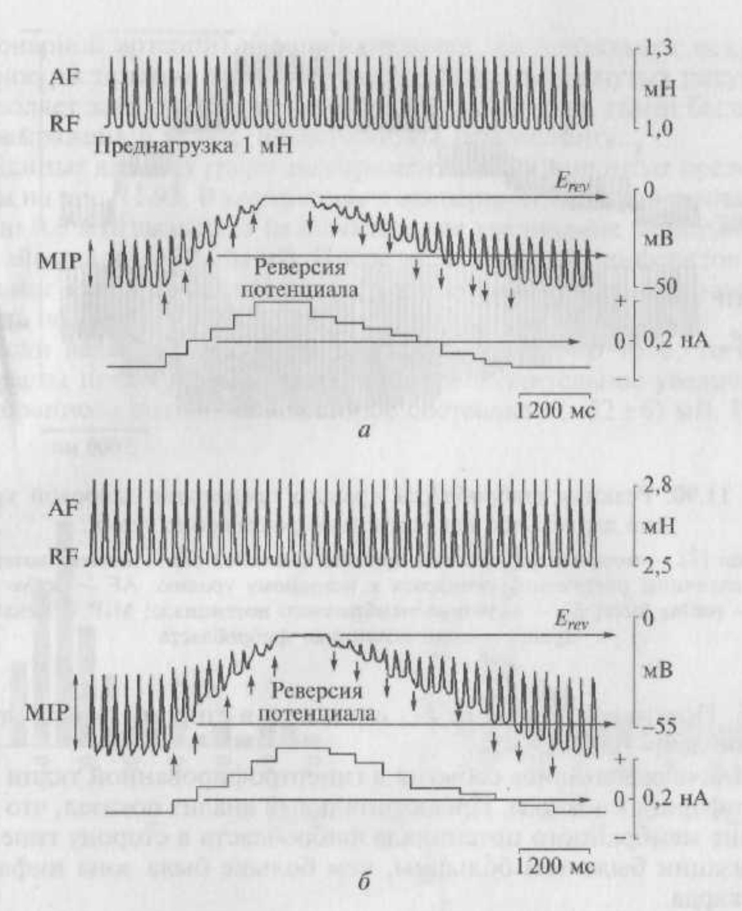


Рис. 11.89. Реакция фибробласта предсердия здоровой крысы на внутриклеточную поляризацию при различном уровне растяжения ткани:

а — resting force на уровне предрастяжения, равного 1 мН. На рисунке показаны величина потенциала реверсии фибробласта на фоне предрастяжения и его реакция на поляризацию мембраны; *б* — resting force на уровне 2,5 мН. Показана величина потенциала реверсии фибробласта на фоне растяжения препарата величиной 2,5 мН и его реакция на поляризацию мембраны; символ (↑) — моменты деполяризации; символ (↓) — моменты гиперполяризации; AF — active force; RF — resting force; E_m — величина мембранного потенциала; MIP — механоиндуцированный потенциал фибробласта; E_{rev} — потенциал реверсии

тенциала, но способствовало уменьшению амплитуды MIP. Устранение растяжения приводило к полному исчезновению этого эффекта.

Растяжение ткани, результат которого показан на рис. 11.89, *б*, увеличивает resting force на 20 %, гиперполяризует мембрану фибробласта от –30 до –55 мВ и увеличивает амплитуду MIP на

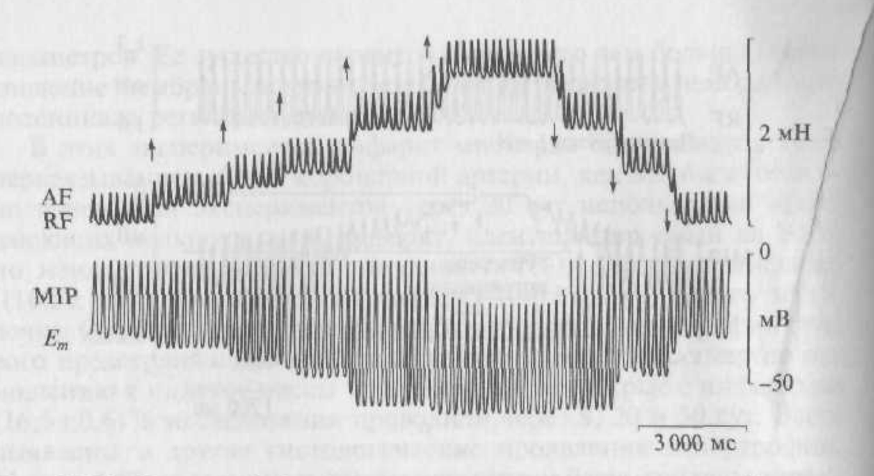


Рис. 11.90. Реакция фибробласта правого предсердия здоровой крысы на длительное искусственное растяжение ткани:

символ (↑) — моменты растяжения препарата; символ (↓) — момент возвращения величины растяжения препарата к исходному уровню; AF — active force; RF — resting force; E_m — величина мембранного потенциала; MIP — механоиндуцированный потенциал фибробласта

60 %. Потенциал реверсии E_{rev} смещался в сторону гиперполяризации до (–10 ± 2,3) мВ.

Иначе развивались события в гипертрофированной ткани после инфаркта миокарда. Предварительный анализ показал, что смещение мембранного потенциала фибробласта в сторону гиперполяризации было тем бо́льшим, чем больше была зона инфаркта миокарда.

Фибробласты предсердий контрольных животных и животных с неидентифицируемым визуально инфарктом миокарда (с мелкоочаговым) имели мембранный потенциал, равный (–22,0 ± 1,9) и (–25,8 ± 2,3) мВ соответственно (рис. 11.91, *а*, *б*). Фибробласты предсердий животных с очаговым инфарктом миокарда (рис. 11.91, *в*) имели мембранный потенциал, равный (–35,9 ± 1,6) мВ, а с обширным — (–46,5 ± 1,8) (рис. 11.91, *г*).

Первая часть экспериментов была посвящена исследованию реакции на растяжение фибробластов у животных с различной величиной инфаркта миокарда, но одинаковым временем после перевязки левой коронарной артерии, которое равнялось 20 сут. Реакция фибробласта предсердия здоровой крысы (см. рис. 11.90) принципиально отличается от реакции фибробласта предсердия крысы, перенесшей инфаркт миокарда левого желудочка (рис. 11.92). На этом рисунке представлена оригинальная кривая реакции фибробласта правого предсердия крысы, перенесшей обширный инфаркт миокарда (40 %, 20 сут после перевязки левой

коронарной артерии) левого желудочка, на длительное искусственное растяжение ткани. Сравнение двух упомянутых рисунков позволяет заключить, что реакция на растяжение ткани была более выражена в ткани, подверженной ремоделингу.

Данные для всех групп экспериментальных животных представлены на рис. 11.93. В контрольных экспериментах растяжение ткани до 0,3 мН вызывало незначительное увеличение мембранного потенциала на (–10 ± 5) мВ. После мелкоочаговых инфарктов растяжение ткани до 0,3 мН вело к увеличению мембранного потенциала на (–15 ± 9) мВ.

Если величина инфаркта равнялась примерно 16 %, то фибробласты предсердия демонстрировали значительное увеличение мембранного потенциала, которое составляло (–52 ± 6) мВ. Реак-

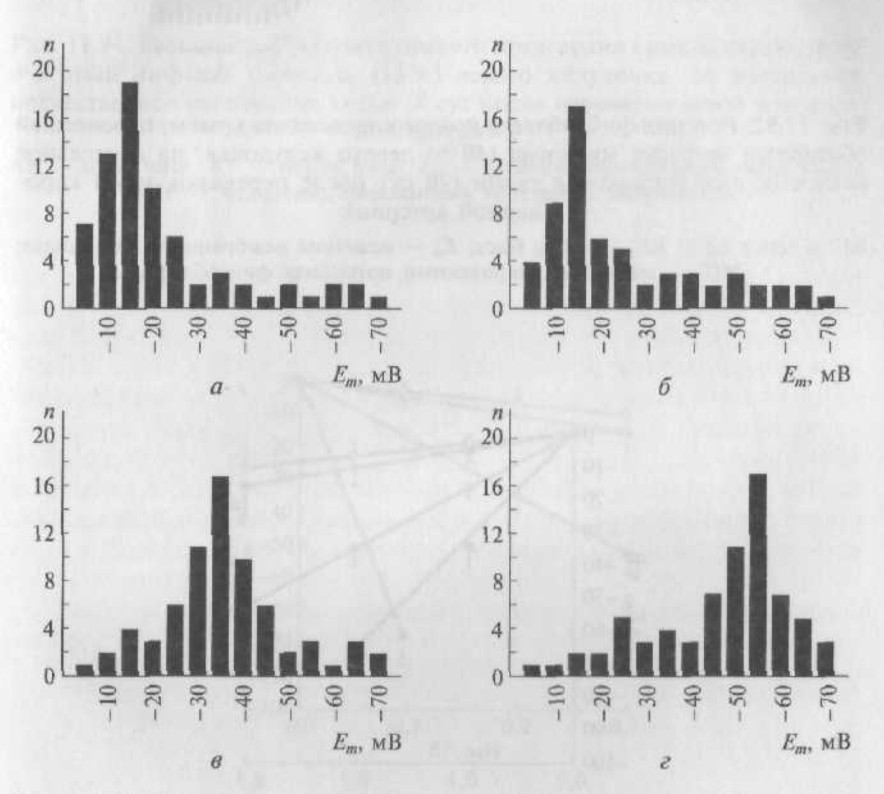


Рис. 11.91. Частотное распределение потенциала покоя мембраны фибробластов предсердия крыс:

а — контрольная группа; *б* — группа крыс, перенесших инфаркт миокарда левого желудочка (20 сут) и имеющих мелкоочаговый инфаркт, идентифицируемый на ЭКГ, но неидентифицируемый визуально (0 %); *в* — группа с очаговым инфарктом ((16,5 ± 0,6) %); *г* — группа с обширным инфарктом ((40 ± 1,3) %) левого желудочка

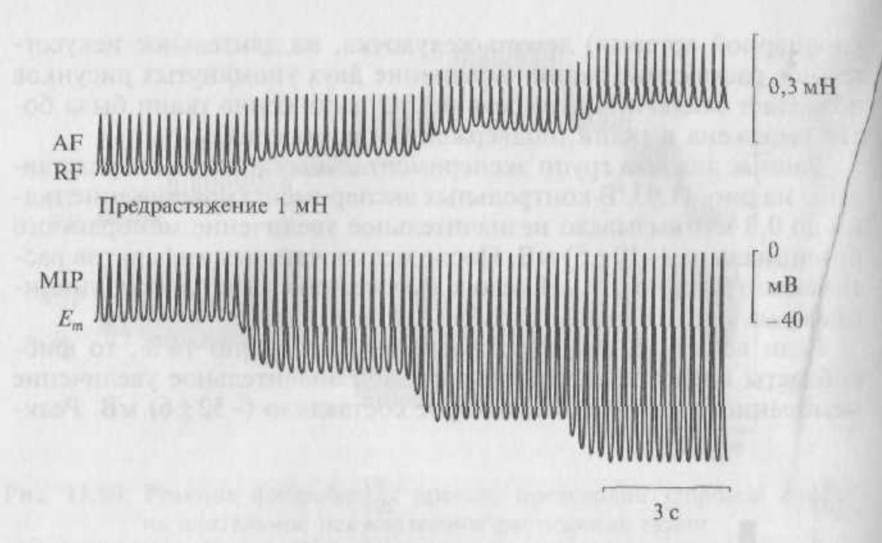


Рис. 11.92. Реакция фибробласта правого предсердия крысы, перенесшей обширный инфаркт миокарда (40 %) левого желудочка, на длительное искусственное растяжение ткани (20 сут после перевязки левой коронарной артерии):

AF — active force; RF — resting force; E_m — величина мембранного потенциала; MIP — механоиндуцированный потенциал фибробласта

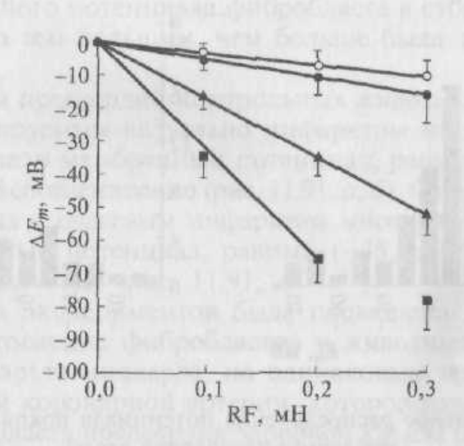


Рис. 11.93. Реакция фибробластов правого предсердия крыс с разной степенью инфаркта миокарда левого желудочка на растяжение ткани:

пустые кружки — контрольная группа; заполненные кружки — мелкоочаговый инфаркт; заполненные треугольники — очаговый инфаркт (16 %); заполненные квадратики — обширный инфаркт (40 %)

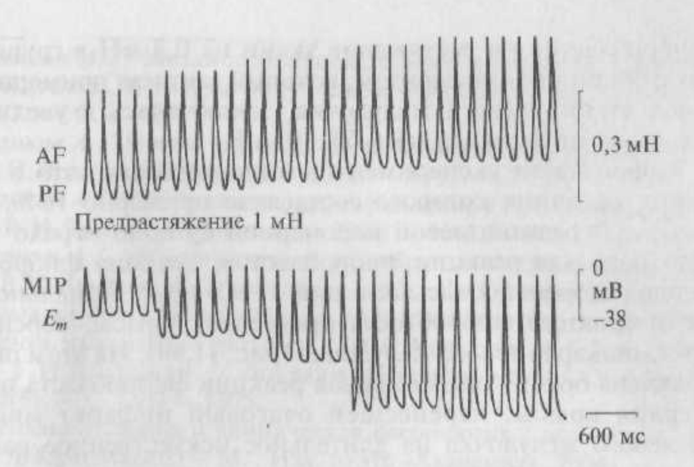


Рис. 11.94. Реакция фибробласта правого предсердия крысы, перенесшей очаговый инфаркт миокарда (16 %) левого желудочка, на длительное искусственное растяжение ткани (8 сут после перевязки левой коронарной артерии):

AF — active force; RF — resting force; E_m — величина мембранного потенциала; MIP — механоиндуцированный потенциал фибробласта

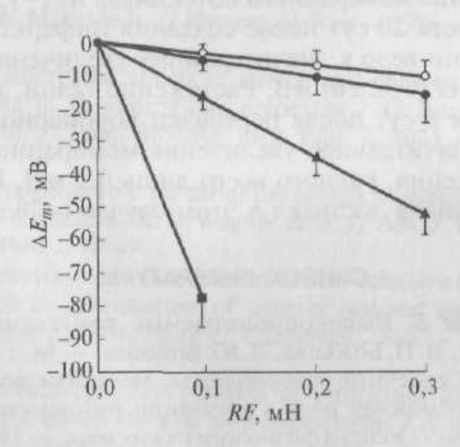


Рис. 11.95. Изменение мембранного потенциала фибробластов правого предсердия крыс с инфарктом миокарда, равным 16 %, в разные периоды после перевязывания коронарной артерии:

пустые кружки — контрольная группа; заполненные кружки — 30 сут после перевязывания коронарной артерии; заполненные треугольники — 20 сут после перевязывания коронарной артерии; заполненные квадраты — 8 сут после перевязывания коронарной артерии

ция фибробластов на растяжение ткани на 0,3 мН в группе животных с обширным инфарктом, который занимал примерно 40 % передней стенки левого желудочка, заключалась в увеличении мембранного потенциала на (–78±9) мВ.

Во второй части экспериментов было показано, что в случае инфаркта, величина которого составляла примерно 16 %, число дней после перевязки левой коронарной артерии играло значительную роль для реакции фибробластов. Реакция фибробласта предсердия здоровой крысы (см. рис. 11.90) принципиально отличается от реакции фибробласта предсердия крысы, перенесшей инфаркт миокарда левого желудочка (рис. 11.94). На этом рисунке представлена оригинальная кривая реакции фибробласта правого предсердия крысы, перенесшей очаговый инфаркт миокарда (16 %) левого желудочка на длительное искусственное растяжение ткани (8 сут после перевязки левой коронарной артерии). Сравнение двух упомянутых выше рисунков позволяет заключить, что реакция на растяжение ткани была более выражена в ткани, подверженной ремоделингу, особенно в его ранние периоды.

Данные для всех групп животных представлены на рис. 11.95. В контрольных экспериментах растяжение ткани, равное 0,3 мН, вело к незначительному увеличению мембранного потенциала на (–10±5) мВ. Через 30 сут после перевязывания коронарной артерии фибробласты также не показывали значительной реакции на растяжение ткани. При растяжении до 0,3 мН фибробласты показывали увеличение мембранного потенциала на (–15±7) мВ. В экспериментах спустя 20 сут после создания инфаркта найдено, что растяжение ткани вело к значительному увеличению мембранного потенциала на (–52±6) мВ. Растяжение ткани, которое производилась спустя 8 сут после перевязки коронарной артерии, показало очень значительное увеличение мембранного потенциала на фоне растяжения, равного всего лишь 0,1 мН. Прирост мембранного потенциала достигал в этом случае (–78±10) мВ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Беркинблит М. Б. Высокопроницаемые контактные мембраны / М. Б. Беркинблит, В. П. Божкова, Л. Ю. Бойцова. — М. : Наука, 1981.

Камкин А. Г. Сердечные фибробласты, механизм возникновения их потенциалов и возможная роль в регуляции работы сердца / А. Г. Камкин, И. С. Киселева // Успехи физиологических наук. — 1998. — № 29(1). — С. 72 — 102.

Камкин А. Г. Механоэлектрическая обратная связь в здоровом сердце и сердце с некоторыми патологиями / А. Г. Камкин, И. С. Киселева // Успехи физиологических наук. — 2000. — № 31(2). — С. 51 — 78.

Камкин А. Г. Ионные механизмы механоэлектрической обратной связи у клеток сердца / А. Г. Камкин, И. С. Киселева, В. Н. Ярыгин // Успехи физиологических наук. — 2001. — № 32(2). — С. 58 — 87.

Камкин А.Г. Механосенситивные ионные каналы / А.Г. Камкин, И.С. Киселева, В.Н. Ярыгин // Успехи физиологических наук. — 2002. — № 33(3). — С. 3 — 37.

Камкин А.Г. Новый тип ионных каналов / А.Г. Камкин, И.С. Киселева, В.Н. Ярыгин // Природа. — 2002. — № 3. — С. 13 — 20.

Камкин А.Г. Фибрилляция, дефибрилляция / А.Г. Камкин, И.С. Киселева, В.Н. Ярыгин // Природа. — 2002. — № 4. — С. 6 — 16.

Камкин А.Г. Механоэлектрическая обратная связь в сердце / А.Г. Камкин, В.Н. Ярыгин, И.С. Киселева. — М. : Натюрморт, 2003.

Киселева И.С. Межклеточное электротоническое взаимодействие в синусном узле сердца лягушки / И.С. Киселева, А.Г. Камкин, Р. Кирхайс, Г.И. Косицкий // Доклады Академии наук СССР. — 1987. — № 292(6). — С. 1502 — 1505.

Фундаментальная и клиническая физиология / под ред. А.Г. Камкина, А.А. Каменского. — М. : Изд. центр «Академия», 2004.

Bett G.C.L. Whole-cell mechanosensitive currents in rat ventricular myocytes activated by direct stimulation / G.C.L. Bett, F. Sachs // J. Membr. Biol. — 2000. — V. 173. — P. 255 — 263.

Bustamante J.O. Stretch-activated channels in heart cells: relevance to cardiac hypertrophy. Morphometry of right ventricular hypertrophy induced by myocardial infarction in the rat / J.O. Bustamante, A. Ruknudin, F. Sachs et al. // J. Cardiovasc. Pharmacol. — 1984. — V. 116. — P. 504 — 513.

Craelius W. Stretch activated ion channels in ventricular myocytes / W. Craelius, V. Chen, N. El-Sherif // Bioscience Reports. — 1988. — V. 8(5). — P. 407 — 414.

Hamill O.P. Pharmacology of mechanogated membrane ion channels / O.P. Hamill, D.W. McBride Jr. // Pharmacol. Rev. — 1996. — V. 48. — P. 231 — 252.

Isenberg G. Differential effects of stretch and compression on membrane currents and [Na⁺]c in ventricular myocytes / G. Isenberg, V. Kazanski, D. Kondratev et al. // Prog. Biophys. Mol. Biol. — 2003. — V. 82(1 — 3). — P. 43 — 56.

Kamkin A. A possible role for atrial fibroblasts in postinfarction bradycardia / A. Kamkin, I. Kiseleva, K.D. Wagner et al. // Am. J. Physiol. — 2002. — V. 282(5). — P. H842 — H849.

Kamkin A. Activation and inactivation of non-selectiva cation conductance by local mechanical deformation of acutely isolated cardiac fibroblasts / A. Kamkin, I. Kiseleva, G. Isenberg // Cardiovasc. Res. — 2003. — V. 57. — P. 793—803.

Kamkin A. Stretch-activated currents in ventricular myocytes: amplitude and arrhythmogenic effects increase with hypertrophy / A. Kamkin, I. Kiseleva, G. Isenberg // Cardiovasc. Res. — 2000. — V. 48(3). — P. 409 — 420.

Kamkin A. Ion selectivity of stretch-activated cation currents in mouse ventricular myocytes / A. Kamkin, I. Kiseleva, G. Isenberg // Pflugers. Arch. — 2003. — V. 446(2). — P. 220 — 231.

Kamkin A. The role of mechanosensitive fibroblasts in the heart / A. Kamkin, I. Kiseleva, I. Lozinsky et al. // Mechanosensitivity in Cells and Tissues / ed. by A. Kamkin, I. Kiseleva. — M. : Academia Publishing House Ltd., 2005. — P. 203 — 229.

Kamkin A. Electrical interaction of mechanosensitive fibroblasts and myocytes in the heart / A. Kamkin, I. Kiseleva, I. Lozinsky, H. Scholz // Basic. Res. Cardiol. — 2005. — V. 100. — P. 337 — 345.

Kamkin A. Mechanically induced potentials in fibroblasts from human right atrium / A. Kamkin, I. Kiseleva, K. D. Wagner et al. // Exp. Physiol. — 1999. — V. 84(2). — P. 347 — 356.

Kamkin A. Characterization of stretch-activated ion currents in isolated atrial myocytes from human hearts / A. Kamkin, I. Kiseleva, K. D. Wagner et al. // Pflugers. Arch. — 2003. — V. 446(3). — P. 339 — 346.

Kamkin A. Mechano-electric feedback in right atrium after left ventricular infarction in rats / A. Kamkin, I. Kiseleva, K. D. Wagner et al. // J. Mol. Cell. Cardiol. — 2000. — V. 32(3). — P. 465 — 477.

Kamkin A. Mechano-electric feedback in the heart: Evidence from intracellular microelectrode recordings on multicellular preparations and single cells from healthy and diseased tissue / A. Kamkin, I. Kiseleva, K. D. Wagner, H. Scholz // Mechanosensitivity in Cells and Tissues / ed. by A. Kamkin, I. Kiseleva. — M. : Academia Publishing House Ltd, 2005. — P. 165 — 202.

Kiseleva I. Calcium and mechanically induced potentials in fibroblasts of rat atrium / I. Kiseleva, A. Kamkin, P. Kohl, M. Lab // Cardiovasc. Res. — 1996. — V. 32(1). — P. 98 — 111.

Kiseleva I. Electrophysiological properties of mechanosensitive atrial fibroblasts from chronic infarcted rat hearts / I. Kiseleva, A. Kamkin, A. Pylaev et al. // J. Mol. Cell. Cardiol. — 1998. — V. 30(6). — P. 1083 — 1093.

Kiseleva I. Mechanoelectric feedback after left ventricular infarction in rats / I. Kiseleva, A. Kamkin, K.D. Wagner et al. // Cardiovasc. Res. — 2000. — V. 45(2). — P. 370 — 378.

Sachs F. Biophysics of mechanoreception // Membrane Biochemistry. — 1986. — V. 6(2). — P. 173 — 195.

Sachs F. Stretch-sensitive ion channels // Neurosci. — 1990. — V. 2. — P. 49—57.

Sachs F. Mechanosensitive ion channels in nonspecialized cells / F. Sachs, C. E. Morris // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. — 1998. — V. 132. — P. 1 — 77.

Sackin H. Stretch-activated potassium channels in renal proximal tubule // Am. J. Physiol. — 1987. — V. 253. — P. F1253—F1262.

Sackin H. A stretch-activated potassium channel sensitive to cell volume // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1989. — V. 86. — P. 1731 — 1735.

Sackin H. Mechanosensitive channels // Ann. Rev. Physiol. — 1995. — V. 57. — P. 333—353.

Zhang Y. H. Stretch-activated and background non-selective cation channels in rat atrial myocytes / Y.H. Zhang, J.B. Youm, H.K. Sung et al. // J. Physiol. (Lond.). — 2000. — V. 523(3). — P. 607 — 619.

ОГЛАВЛЕНИЕ